

**NÉHÁNY SZEXUÁLISAN ÁTVIHETŐ  
KÓROKOZÓ KORSZERŰ  
MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATA**

**Ph. D. értekezés**

***Dr. Dósa Erika***

**Szegedi Tudományegyetem, ÁOK  
Klinikai Mikrobiológiai Diagnosztikai Intézet  
2001.**

## TARTALOMJEGYZÉK

<b>I.</b>	<b>BEVEZETÉS</b>	<b>Oldalszám</b>
<b>1.</b>	<b>A hüvely normál flórája</b>	<b>2</b>
1. 1.	A hüvely normál flóráját befolyásoló tényezők	4
1. 2.	A <i>Lactobacillus</i> spp.-ek szerepe a hüvely normál flórájának fenntartásában	4
<b>2.</b>	<b>Szexuálisan átvihető megbetegedések (STD: Sexually Transmitted Diseases)</b>	<b>5</b>
<b>2. 1.</b>	<b>Bakteriális vaginózis (BV)</b>	<b>6</b>
2. 1. 1.	A BV klinikai tünetei	7
2. 1. 2.	A BV laboratóriumi diagnosztikájának lehetőségei	9
<b>2. 2.</b>	<b>Vulvovaginális vaginitisek (Vvv)</b>	<b>11</b>
2. 2. 1.	Sarjadzó gombák által okozott STD megbetegedések	11
2. 2. 2.	Sarjadzó gombák által okozott urogenitális fertőzések klinikai tünetei	12
2. 2. 3.	A sarjadzó gombák által okozott urogenitális fertőzések laboratóriumi diagnosztikájának lehetőségei	13
<b>2. 3.</b>	<b>Mycoplasmák szerepe az urogenitális infekciókban</b>	<b>15</b>
2. 3. 1.	Urogenitális mycoplasma fertőzések klinikai kórképei	16
2. 3. 2.	Urogenitális mycoplasmák kimutatásának laboratóriumi lehetőségei	18
<b>2. 4.</b>	<b>Trichomonosis</b>	<b>19</b>
2. 4. 1.	A trichomonosis klinikai tünetei	19
2. 4. 2.	A trichomonosis laboratóriumi diagnosztikájának lehetőségei	20
<b>II.</b>	<b>CÉLKITÚZÉSEK</b>	<b>21</b>

<b>III.</b>	<b>ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK</b>	<b>23</b>
<b>1.</b>	<b>Mintavétel</b>	<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>Referencia törzsek</b>	<b>23</b>
<b>3.</b>	<b>Tenyésztési eljárások</b>	<b>23</b>
<b>3.1.</b>	<b>Aerob baktériumok tenyésztése</b>	<b>23</b>
<b>3.2.</b>	<b>Bakteriális vaginózis irányú vizsgálatok</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>Sarjadzó gombák kimutatásának lehetőségei</b>	<b>26</b>
<b>4. 1.</b>	<b>Sarjadzó gombák azonosítása</b>	<b>26</b>
<b>4. 1. 2.</b>	<b>Sarjadzó gombák antifungális szerek iránti érzékenységének meghatározása</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>M. hominis és U. urealyticum törzsek kimutatásának lehetőségei</b>	<b>29</b>
<b>5. 1.</b>	<b>Mycoplasmák tenyésztése, azonosítása</b>	<b>29</b>
<b>5. 2.</b>	<b>Mycoplasmák antibiotikum érzékenységének meghatározása</b>	<b>30</b>
<b>6.</b>	<b>Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása az urogenitális infekciók diagnosztizálásában</b>	<b>31</b>
<b>6. 1.</b>	<b>Az urogenitális kórokozók kimutatása tenyésztéssel és génpróbával tenyésztéssel és génpróbával</b>	<b>31</b>
<b>6. 2.</b>	<b>M. genitalium kimutatása PCR módszerrel</b>	<b>32</b>
<b>IV.</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS</b>	<b>34</b>
<b>1.</b>	<b>Aerob és anaerob módon végzett tenyésztések eredményei</b>	<b>34</b>
<b>1.1.</b>	<b>Egészséges, tünet- és panaszmentesek páciensektől származó vizsgálati anyagok tenyésztési eredményei</b>	<b>34</b>
<b>1.2.</b>	<b>Urogenitális apparatus gyulladásában szenvedők vizsgálati anyagainak, aerob és anaerob tenyésztési eredményei</b>	<b>37</b>
<b>1.3.</b>	<b>IUD alkalmazása és a BV között lehetséges összefüggések</b>	<b>42</b>

1. 3. 1.	IUD minták tenyésztése során nyert eredmények	42
1. 3. 2.	CLSM vizsgálatok eredményei	44
<b>2.</b>	<b>Sarjadzó gomba irányú vizsgálatok eredményei</b>	<b>46</b>
2. 1.	<i>Candida</i> spp. identifikálása során nyert eredmények	46
2. 2.	Sarjadzó gomba törzsek antimycotikum érzékenységének meghatározása	46
2. 2. 1.	Sarjadzó gomba törzsek érzékenységének összehasonlító vizsgálatai makro-leves hígításos módszerrel és E teszttel	49
2. 2. 2.	BIOMIC Video System-el végzett érzékenységi vizsgálatok eredményei	55
<b>3.</b>	<b>Mycoplasma irányú vizsgálataink eredményei</b>	<b>58</b>
3. 1.	Referencia törzsek MIC értékének összehasonlító vizsgálata	58
3. 2.	Klinikai mintákból izolált <i>M. hominis</i> és <i>U. urealyticum</i> törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározása	59
<b>4.</b>	<b>Molekuláris biológiai módszerek a vulvovaginális vaginitisek diagnosztikájában</b>	<b>62</b>
4. 1.	Gén próbával végzett vizsgálatok	62
4. 1. 1.	Affirm VP III kit érzékenységének vizsgálata	62
4. 1. 2.	Klinikai minták gén próbával végzett vizsgálatának eredményei	63
4. 2.	PCR-el végzett vizsgálatok eredményei <i>M. genitalium</i> kimutatására	67

## IRODALOM



## RÖVIDÍTÉSEK

5FC	5-fluorocytosine
A7	Mycoplasma és ureaplasma agar táptalaj
ATCC	American Type Culture Collection
BEA	Arginin tartalmú bouillon mycoplasma tenyésztésre
BEG	Glukóz tartalmú bouillon mycoplasma tenyésztésre
BV	Bakteriális vaginózis
CFU	Colony Form Unit/telepképző egység
CLSM	Confocale laser scanning microscope
DFÉ	Dózisfüggő érzékenység
DMSO	Dimethyl sulphoxide
DNS	Dezoxi-ribonukleinsav
EO	Eozin-metilénkék táptalaj
EPS	Expressed prostatic secretion
É	érzékeny
FITC	Fluorescens izotiocianat
GT	Germ tube
HIA	Heart Infusion Agar mycoplasma tenyésztésre
IC	Internal control
IUD	Intrauterin Diveice
MÉ	Mérsékelten érzékeny
MIC	Minimale inhibitor concentration
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NGU	Non-gonorrhoeae-s urethritis
PCR	Polimeráz láncreakció
SP-4	<i>M. genitalium</i> tenyésztésére szolgáló táptalaj
STD	Sexual Transmitted Disease
TM	Thayer-Martin agar táptalaj <i>N. gonorrhoeae</i> dg.
U-9	Ureaplasma tenyésztésre szolgáló táptalaj
Vvv	Vulvovaginális vaginitis

## **AKIKNEK KÖSZÖNETTEL TARTOZOM**

Elsősorban köszönettel tartozom Dr. Nagy Erzsébet Professzor Asszonynak, aki ráirányította figyelmemet a szexuálisan átvihető megbetegedések mikrobiológiai diagnosztikájának problémáira, és megszerettette velem az anaerob baktériumok diagnosztikáját, minden feltételt biztosított laboratóriumunkban a sokszor bizony költséges vizsgálatok elvégzéséhez. Neki köszönhetem, hogy a rutin munka mellett a tudományos munka iránt felkeltette érdeklődésemet. Köszönöm szakmai tanácsait, és emberi hozzáállását, „lelki támaszát”, amelyek nélkülözhetetlenek voltak a vizsgálatok elvégzéséhez és a disszertációm befejezéséhez.

Köszönettel tartozom szerzőtársaimnak és munkatársaimnak, akik munkám egy-egy szakaszában segítőim voltak. Külön köszönettel tartozom Dr. Szőke Ildikó, Urbán Edit, Dr. Veréb Ilona kolleganőimnek, és Mészáros Kasza Ernesztina, Oravecz Andrea asszisztenseknek, akik munkám során közvetlen segítséget nyújtottak.

Köszönöm családom minden tagjának, hogy a Tőlük „ellopott időt” az értekezés elkészítésére fordíthattam.

## I. BEVEZETÉS

A II. világháború után úgy tűnt, hogy az ún. „klasszikus nemi betegségek” (syphilis, gonorrhoea, ulcus molle) a világszerte bevezetett penicillin kezelésnek köszönhetően, már nem jelentenek terápiás problémát. Az 1970-es évek végére azonban a venerológia új problémákkal került szembe. A tradicionális nemi betegségek mellett számos új kórokozóról is bizonyították, hogy leggyakrabban szexuális úton (szexuális érintkezéssel) terjedhetnek. A „Sexually Transmitted Diseases” (STD) elnevezés erre az időszakra tehető. Az STD fogalma, mely már a hazai köztudatban is elterjedt, kifejezi e betegségek fertőző voltát, másrészt a terjedés módját is. A tradicionális nemi betegségek mellett az ún. egyéb STD kórokozók a diagnosztikus eljárások fejlődésével egyre inkább az érdeklődés előterébe kerültek.

Az STD megbetegedések az egyéb eredetű megbetegedések között jelentős szerepet játszanak, annak ellenére, hogy a szexuális úton közvetített fertőzések beleértve a klasszikus nemi betegségeket is az esetek döntő többségében nem véletlen infekciók.

A szexuális élettel kapcsolatos felfogás megváltozása, a promiszkuitás, a prostitúció, drog és alkohol hatása, az egyre fiatalabb korban elkezdett szexuális élet magukban hordozzák a fertőzés akvirálásának lehetőségét. A klinikailag tünetmentes betegek mellett egyre nyilvánvalóbb, hogy a tünetmentes hordozók, ill. a késői komplikációkkal jelentkezők az infekciók továbbvitelében hangsúlyozott szerepet játszanak. Utóbbi jelentősége a meddőség, koraszülések, abortuszok és nőgyógyászati tumorok szempontjából ma már nem kérdőjelezhető meg (40,46,62). Helytelen, vagy késői diagnózis esetén, az infekció nyomán kialakuló gyulladás egyik következménye a „functio laesa”, ami az érintett szervek működésének megváltozását, szexuálisan átvihető megbetegedések esetében a reprodukciós képesség csökkenését eredményezheti. A diagnosztikus eljárások fejlődésének köszönhetően, az utóbbi évtizedekben az STD fertőzések új generációjával kellett megismerkednünk, melyek a klasszikusnak számító nemi betegségekkel ellentétben, gyakran tünetmentes fertőzés formában zajlanak, megnehezítve a korai diagnózis felállítását.

## 1. A hüvely normál flórája

Közel egy évszázad telt el azóta, hogy Döderlein (1892) a fiziológiás és a patológiás hüvelyi baktériumflóra közötti különbség jelentőségére felhívta a figyelmet. Feltételezte, hogy az egészséges hüvelyben, nagy számban megtalálható hosszú pálcák (Döderlein-bacillusok) védelmet nyújtanak a lokális és az aszcendáló fertőzésekkel szemben. A hüvelyflóra megítélése hosszú éveken keresztül a hüvelyváladék Gram-szerint festett kenete alapján történt. A Döderlein-bacillusok jelenléte a normál hüvelyflórát jelentette. A mikrobiológiai tenyésztési eljárások (aerob és anaerob) fejlődése következtében nyilvánvalóvá vált, hogy a normál hüvelyflórát egyrészt a különböző *Lactobacillus* speciestek dominanciája, másrészt számos fakultatív és obligát anaerob baktérium kisebb-nagyobb csíraszámú jelenléte jellemzi (4). Ez a komplex flóra minőségi és mennyiségi változásokon mehet át (életkor, hormonstátusz függvényében).

Kvalitatív/kvantitatív tenyésztési eredményekről beszámoló irodalmi adatok szerint az aerob baktériumok száma  $10^6$ - $10^8$  telepképző egység/ml, míg az anaerob baktériumok száma  $10^7$ - $10^9$  telepképző egység/ml a hüvelyváladékban (71,74). A leggyakrabban izolált aerob baktériumok, az aerob laktobacillusok különböző speciestek, koaguláz-negatív staphylococcusok, corynebakteriumok és streptococcusok. A laktobacillusok dominanciája a fogamzóképes korban lévő egészséges nők hüvelyváladékában minden esetben megtalálható, de a vizsgálatok egy jelentős részében az aerob laktobacillusok egymástól való differenciálása nem történt meg. A streptococcusok közül az  $\alpha$ -haemolizáló és nem-hemolizáló streptococcusok jelenléte a leggyakoribb, de normális körülmények között is gyakoriak az enterococcusok és B csoportú streptococcusok (*Streptococcus agalactiae*) (21,22). A *Gardnerella vaginalis* izolálási aránya jelentős különbséget mutat a különböző vizsgálatssorozatokban (20-58%) és nagymértékben függ az izolálási módszerektől, valamint a szelektív táptalajok alkalmazásától. A Gram-negatív aerob baktériumok előfordulási aránya a hüvelyváladékban jóval ritkább, mint a Gram-pozitív baktériumoké. Az *Escherichia coli*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* speciestek mellett kis százalékban a *Haemophilus* spp. és az *Acinetobacter* spp. előfordulásával is számolni kell. Az anaerob Gram-pozitív *Lactobacillus* speciestek mellett kis számban, de megtalálhatók a *Bifidobacterium*, *Eubacterium* és *Propionibacterium* speciestek is. A vizsgált nők hüvelyváladékának 18%-ában különböző

*Clostridium* speciesek, köztük a *C. perfringens* is kimutatható volt, ami különösen jelentős, hiszen az életet is veszélyeztető uterus-myonecrosis okozója lehet. A Gram-negatív anaerob pálcák közül a *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* és *Fusobacterium* speciesek dominálnak. A Gram-negatív anaerob coccusok (*Veillonella* spp.), bár csak kis csíraszámban, de a tünet-panaszmentes nők egynegyedének hüvelyváladékában megtalálhatók voltak (74,110). Egyes szerzők szerint a hüvely normál flórája hasonlít a székletflórához, a részletesebb analízis bizonyította, hogy mind a speciesek előfordulási gyakorisága, mind a mennyiségi viszonyok eltérőek egymástól.

A nők közel 30%-a hordoz tünetmentesen a hüvelyében sarjadzó gombát alacsony csíraszámban. Bár csak a felmérések egy részénél történt meg a *Mycoplasma hominis* és az *Ureaplasma urealyticum* hordozás irányában végzett szelektív tenyésztés, de ezek a mikroorganizmusok is jelen lehetnek tünetmentes nők hüvelyváladékában (79). Különböző országok kutatóinak vizsgálati adatait figyelembe véve, a panasz és tünetmentes nők hüvelyváladékában előforduló mikroorganizmusok megoszlása igen szélsőséges. Az 1. táblázatban az alábbi szerzők adataiból a szélsőséges értékeket foglaltuk össze.

### 1. táblázat

**Egészséges nők hüvelyváladékából izolált  
mikroorganizmusok megoszlása különböző szerzők alapján.  
(3, 46, 74,77, 93)**

<b>Mikroorganizmusok</b>	<b>Előfordulási Százalék ( %)</b>
Aerob laktobacillusok	45-88
<i>Enterobacteriaceae</i> speciesek	4-36
Egyéb anaerob Gram-pozitív	2-64
Egyéb aerob Gram-pozitív	8-72
Anaerob <i>Lactobacillus</i>	12-45
Sarjadzó gomba	4-30
Anaerob Gram-negatív	2-63

### 1. 1. A hüvely normál flóráját befolyásoló tényezők

A hüvely normál flóráját több tényező együttes hatása befolyásolja: a hüvely laphámsejtek glükogén és glükóz tartalma, kor, hormonális állapot, születésszabályozási módszerek (orális fogamzásgátlók, intrauterin fogamzásgátlás, lokálisan alkalmazott spermicid krémek), menstruáció, coitus, terhesség, szülés, trauma, rosszindulatú daganat, műtét, nőgyógyászati beavatkozások, besugárzás, antibiotikum terápia, immunszuppresszív terápia, higiénés szokások (79).

### 1. 2. A lactobacillusok szerepe a hüvely normál flórájának fenntartásában

A hüvely a születés utáni órákban steril, de néhány óra alatt benépesedik a normál bőrflórával, majd ezt követően néhány napig még a magzati keringésből származó anyai hormonok hatására termelt glikogén tejsavvá bontása következtében, enyhén savanyúvá válik. Ezért átmenetileg lactobacillusok szaporodnak el benne, majd amikor az anyai hormonok a vizelettel kiürülnek, a váladék vegyhatása ismét lúgos irányba tolódik el, így az előbb említett bőrflóra alkotja ismét a hüvelyflóra túlnyomó többségét. Ez az összetétel marad fenn a pubertásig, amikor is a hormonális hatásra glikogén halmozódik fel a hüvelyfalban, és a lactobacillusok ismét uralkodó szerephez jutnak. A hüvelyflóra a menopauza után a pubertáskor előtti összetételt veszi fel ismét (61,93). A legelfogadottabb felfogás, hogy a premenopausában levő nők ösztrogén termelésének hatására nő a glikogén mennyisége a hüvely laphámsejtjeiben, mely glükózzá, majd tejsavvá bomlik a jelenlévő lactobacillusok metabolikus aktivitása következtében. Az így kialakult alacsony pH (3,5-4,5) a lactobacillusok további dominanciájának kedvez, de egyben gátolja a savas pH-t nem kedvelő egyéb baktériumok szaporodását is a hüvelyben. A lactobacillusok és fakultatív patogén baktériumok közötti ökológiai egyensúly fenntartásában az antibiózis jelenségének fontos szerepe van. Így például befolyásolja az ökológiai egyensúlyt a peroxid termelő és nem termelő lactobacillusok mennyiségi alakulása a hüvelyben (48), a savas pH, a lactobacillusok bakteriocin- és egyéb toxikus komponensek termelése, a lactobacillusok és egyéb baktériumok vasért való vetélkedése, a hüvely laphámsejtjeihez történő adszorpció, valamint az egyes *Lactobacillus* speciesek különböző pH-n történő kötődése a hüvely nyálkahártyáján lévő fiziológiás fehérjékhez.

A laktobacillusok in vitro átlagos kitapadása a hüvely laphámsejtjeihez egészséges nőkben  $36,1 \pm 18,5$  laktobacillus/laphámsejt, míg bakteriális vaginózisban (BV)  $8,4 \pm 5,3$  (70).

## 2. Szexuálisan átvihető megbetegedések

### (STD: Sexually Transmitted Diseases)

A szexuálisan átvihető betegségek kórokozói legtöbb esetben nemi érintkezés útján terjednek, de nem zárható ki a genitális váladékkal történő direkt és indirekt terjedés másféle útja sem (pl. *Chlamydia trachomatis* fertőzés által indirekt úton szerzett conjunctivitis, a *S. agalactiae* által okozott újszülöttkori légúti fertőzés, meningitisz, szepszis).

A specifikus vaginitisek kialakulása szexuális aktus, azaz nyálkahártya-kontaktus révén jöhet létre és terjedhet tovább. Tekintettel arra, hogy a kórokozó a hengerhámval borított nyálkahártya felszínéhez képes kötődni, a cervix, az urethra, a rectum és a pharynx nyálkahártyáján is megtelepszik, tehát orális és anális érintkezés révén is átadható, de áterjedhet a csecsemőre a szülőcsatornán való áthaladáskor is (40,134). A rizikófaktorok közül a legkiemelkedőbb a betegségek terjedésében a gyakori és több partnerrel történő alkalmi kapcsolatok. Monogám párkapcsolat idején is manifesztálódó megbetegedést eredményezhet a kórokozó látens vagy perzisztáló jelenléte a szervezetben. A megbetegedés terjedését ugyancsak befolyásolják az életkor, a fogamzásgátlási módszerek, az alkohol, a kábítószer és a dohányzás. Egyéb etiológiai tényezők a nem megfelelő higiénia, hormonális és mechanikai okok.

Nem megfelelő higiénia esetén közösüléskor a fitymzsákban kolonizálódó, illetve a spermában levő baktériumok bejutnak a hüvelybe. Előfordulhat, hogy a székletben, vizeletben levő kórokozók szétkenődnek a vulván és a helytelen tisztálkodási szokások ill. a nem megfelelő tisztálkodás miatt aszcendáló fertőzést okozhatnak.

A petefészek eltávolítása után, vagy menopauzában a hormonális változások miatt, az alacsony ösztrogénszint következtében a Döderlein-flóra eltűnik a hüvelyből. A hám sorvad és a fertőzések számára fogékonyabb lesz. Terhességben és menstruációkor a megváltozott hormonális viszonyok segítik elő a baktériumok megtelepedését. Multifaktoriális analízisek bizonyították, hogy az orális fogamzásgátlók és a kondom

védelmet nyújtanak a szexuális úton terjedő betegségek többségében. Az orális fogamzásgátlók a bennük levő hormonösszetétel miatt növelik a vagina laphám sejtjeinek glikogén tartamát, ami a laktobacillusok számára szubsztrátként szolgál a tejsav termeléséhez. Ha idegen test kerül a hüvelybe (maszturbáció vagy az intravaginális tamponok használata során), a hámfelület felsértésével, ill. a mechanikai hatás miatt az exogén kórokozók bevitelével, vagy az endogén flóra mélyebb rétegekbe jutásával elősegíthetik a kórokozók elszaporodását.

## 2. 1. Bakteriális vaginózis (BV)

Vizsgálati eredmények bizonyítják, hogy a BV kórképet -a szexuális úton terjedő betegségektől eltérően- nem egyetlen kórokozó elszaporodása jellemzi, hanem a normál hüvelyflórától eltérő összetételű kórokozók okozzák. A kórokozó elszaporodásától függően beszélünk típusos vaginitisről, melyet kifejezett gyulladásos tünetek kísérnek, illetve nem-típusos vaginózisról, amelyet nem kísérnek típusos gyulladásra jellemző tünetek. A hüvelyre lokalizálódó infekciók közül a típusos vaginitis esetében a jellegzetes klinikai tünetek hátterében jól ismert kórokozók várhatóak (bélflóra baktériumai, sarjadzó gombák, *T. vaginalis*), míg a nem-típusos vaginitis eseteiben, számos ellentmondás lehetséges. Az utóbbi évek vizsgálatai szerint az e kórképekben szenvedők hüvelyváladékában kifejezett gyulladásos tünetek nélkül nagy számban fordulnak elő a legkülönbözőbb mikroorganizmusok, (anaerob baktériumok, mycoplasmák) amelyek kimutatása a hagyományos tenyésztési eljárásokkal hosszadalmas. Az 1954-ben Gardner és Duke a *Haemophilus vaginalis* (38), 1963-ben Zimmerman és Turner a *Corynebacterium vaginale* (142), majd 1980-ban Greenwood és Pickett (42), *Gardnerella vaginalis*-ként besorolt Gram-variábilisan festődő coccobacillust tette felelőssé a „nonspecific vaginitis” tüneteért. Ma már tudjuk, hogy megfelelő szelektív tenyésztési eljárásokat alkalmazva, az egészséges nők 2-64%-ának a hüvelyváladékából is kimutatható a *G. vaginalis*. Statisztikai adatok kimutatták, hogy az életkor nem befolyásolja a BV megjelenését, sőt a *G. vaginalis* izolálási aránya szexuális életet nem élő fiatal lányokban megközelítőleg azonos a szexuális aktivitással rendelkező nők és a prostituáltak izolálási arányával, így prepubertás alatt és menopauzában levő nőknél is előfordul, mégis a legfogékonyabb a szervezet a reprodukív évek alatt (61,74).



Az ilyen összetételű flóra, valamint a tünetegyüttesek jelölésére a nemzetközi irodalom először az anaerob vaginózis, majd Weström javaslatára 1984-ben a "bakteriális vaginosis" (BV) elnevezést fogadta el (139). Abban az esetben, ha a hüvely ökológiai egyensúlya valamely tényező következtében felborul, és a laktobacillusok dominanciáját, a pH radikális emelkedése mellett felváltja egy vegyes anaerob baktérium flóra, a BV jellegzetes klinikai tünetei jelennek meg. A laktobacillusok számának csökkenésével jelentős pH emelkedés figyelhető meg, valamint olyan endogén baktériumok elszaporodása, amelyek a normál hüvelyflóra tagjaiként is jelen vannak. Így jelentős mértékben növekszik a *G. vaginalis* izolálási aránya (magasabb csíraszám), valamint a mycoplasmák (*M. hominis*, *U. urealyticus*) a *Mobiluncus* speciesek (*M. curtisi*, *M. mulieris*), *Peptostreptococcus* speciesek, anaerob Gram-negatív pálcák (*Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*) és a fakultatív aerob baktériumok száma. Egyes kutatók között vita tárgyát képezi az, hogy a BV szexuálisan átvihető megbetegedés vagy endogén infekció.

### 2. 1. 1. A BV klinikai tünetei

A BV klinikai igazolását a négy jellemző tünet (AMSEL-féle kritériumok) közül három egyidejű jelenléte biztosítja (1):

1. homogén, szürkésfehér, a szeméremrészben megjelenő és a hüvelyfalhoz tapadó fluor
2. a hüvelyváladék pH-ja a normál értéknél magasabb (>4,5)
3. pozitív kálium-hidroxid próba (amin teszt)
4. a mikroszkópos kenetben ún. „clue” sejtek (kulcs-sejtek) jelenléte

„Clue” sejteknek nevezzük azokat a hüvelyfalról lesodródó hámsejteket, melyek felszínéhez nagyszámú, Gram-variábilis coccobacillus tapad.

A BV-ben szenvedő nők klinikai tünetei eltérnek az egyéb, hüvelyi folyással járó infekciók tüneteitől. A képet egy szürkés-fehéres bő, tejszerű, homogén fluor dominálja, amely állandó nedvességérzést jelent a beteg számára. A váladék szaga kellemetlen, jellegzetes, rothadt halra emlékeztető. A nedvességérzéshez égő, viszkető érzés társul, lobos tünetek nélkül. A betegség hónapokig, évekig tarthat, a partnerek tünetmentesek lehetnek (32,120). A BV-nek számos szülészeti és nőgyógyászati szövődménye ismert. Nőgyógyászati kórképek közül a nők 20-30%-ánál vaginitis, típusos folyás, cervicalis

dysplasia, salpingitis, endometritis, recurrens húgyúti infekció, postoperatív infekciók, kismencedei gyulladások formájában jelennek meg. A szülészeti szövődmények közül a chorioamnionitis, korai burokrepedés, koraszülés, alacsony születési súly, postpartum endometritis és az amnionitis fordul elő leggyakrabban (41, 82). A bakteriális vaginózis endogén ill. exogén eredetű voltának igazolása, azaz szexuálisan átvihető megbetegedése, kell-e a bakteriális vaginózisban szenvedő páciens partnerét is kezelni, ma még kutatott téma (32,86,123,124).

Az urogenitális szervek gyulladásos folyamataiban kockázati tényezőt jelent az intrauterin eszköz alkalmazása. Ezek műanyag alapú, részben különböző nemesfémekkel borított anyagok, a hüvelyből feljutó biofilmképző aerob és anaerob baktériumok, gombák számára egy kiváló felszínt biztosítanak, ahol kolonizációt követően súlyos gyulladásos folyamat kialakulását idézhetik elő.

1991-ben Hiroyuki Kobayashi (66) számolt be, a krónikus cholangitises betegekből kivett epekövek felszínén talált vaskos biofilm képződéséről, amely elfedte a gyulladást fenttartó *Pseudomonas aeruginosa* jelenlétét. A szervezetben lévő úgynevezett idegen anyagok, sérült szövetek, bioanyagok predilekciós helyei a biofilm képződésnek. Az intrauterin fogamzásgátló eszközök (IUD) mellett a biofilm képzésre a katéterek, kanülök, műanyag alapú implantátumok (43,80,141), szemészeti műlencsék (117), fogkoronák, fogművek, traumatológiai lemezek, csavarok, szegecsek, epe- és vesekövek, ízületi protézisek felszínei is alkalmasak. A leggyakoribb kórokozónak az *Enterobacter* spp. *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* spp. anaerob baktériumok valamint a *Candida albicans* bizonyultak (17,37,90,91,96,99,141). A biofilmképző kórokozók speciális rezisztencia problémát jelentenek, mivel az antimikrobiális szerek áthaladása a biofilmen csak néhány esetben valósul meg (2,44). Az in vitro érzékenységi vizsgálatok eredményeivel ellentétben, így nem mindegyik szer alkalmas terápiára. Az urogenitális szervek gyulladásos folyamatainak kezelésében első helyen a béta-laktám, béta-laktám+béta-laktamáz gátlóval kombinált, a tetracyclin és a fluorokinolon típusú antibiotikumok állnak. Ezek az antibiotikumok nem alkalmasak arra, hogy az in vitro érzékenységgel ellentétben in vivo, a mikroorganizmus által képzett biofilmen áthatoljanak. Jelen ismereteink szerint a néhány macrolid típusú antibiotikum (43, 51) képes ezen a biomatrixon áthaladni.



### **2. 1. 2. A BV laboratóriumi diagnosztikájának lehetőségei**

Az anaerob baktériumok tenyésztési és identifikálási nehézsége miatt az általuk okozott fertőzések diagnózisa legtöbbször klinikai diagnózis, mivel kevés rutin laboratórium rendelkezik olyan háttérrel (gyakran csak a referencia laboratóriumok), amely lehetővé tenné szexuálisan átvihető atípusos kórokozók komplett vizsgálatát. A terápia is ennek megfelelően sokszor empirikus és az anaerob referencia laboratóriumok által szolgáltatott érzékenységi adatok alapján választott, legtöbbször kombinált, aerob és anaerob baktériumokra is hatásos antibiotikumok együttes alkalmazását jelenti. Egyre több adat bizonyítja, hogy a korábbiakkal ellentétben az anaerob baktériumok között, az aerob baktériumoknál már jól ismert rezisztens izolátumok száma nő. Ezért az empirikus kezelés sikertelensége esetén a mikrobiológiai laboratórium által elvégzett pontos baktérium identifikálás, antibiotikum érzékenység meghatározás birtokában a célzott antibiotikus kezelés eredményezheti a beteg gyógyulását.

A BV klinikai diagnózis, melyet elősegít a pH mérés indikátor papírral, valamint az „amin” teszt, mely alkalmazása során a hüvelyváladékhoz 1-2 csepp 10%-os KOH-ot adnak (1,32,120). Az alkalizáció során keletkező aminok hatására a halszag fokozódik. A „clue” sejtek 400x szoros nagyítással történő mikroszkópos vizsgálata, a klinikai tünetek alapján diagnosztizált BV-vel, megközelítőleg 85%-os pontosságúnak bizonyul (31,45,47,60,119). A BV diagnosztikájában alkalmazott egyéb módszerek: Gram-szerint festett kenet mikroszkópos vizsgálata, a hüvelyváladék anaerob-aerob tenyésztése párhuzamosan, gáz-folyadék kromatográfia (anyagcseretermékek kimutatása, szukcinát/laktát arány meghatározása), DNS próbák állnak még rendelkezésünkre (7,121,122). A BV előfordulását különböző szerzők, az általuk vizsgált populációban elég szélsőségesnek találták. (2. táblázat)

**2. táblázat.**

**A BV előfordulásának  
gyakorisága (45, 47, 62,71,74)**

<b>Vizsgált populáció</b>	<b>Előfordulási százalék (%)</b>
Szülészeti intézetek	10-25
Családtervezési intézetek	23-30
STD klinikák	33-64
Tünetmentes populáció	5-10

A szisztémásan történő antimikróbás szerek alkalmazása mellett rendszerint lokális hüvelyi kezelést is alkalmaznak, melynek célja a fiziológiás hüvelyi milliő helyreállítása, valamint a helyi tünetek enyhítése. A pH és a hüvely normál flórájának visszaállítása érdekében különböző hüvelykúpokat, hüvelytablettákat és tejsavas hüvelyöblítést alkalmaznak. A BV diagnózis esetén a kezelés kiválasztásakor gondolni kell arra, hogy olyan antimikróbás szert alkalmazzunk, amely a normál flórát, a laktobacillusokat legkevésbé gátolja, lehetőleg csak a kórokozók ellen fejtsen ki gátló hatást. A genitális fluor kezelését mindig komplex módon kell elvégezni. Feltétlenül szükséges a szexuális partner/ek egyidejű kezelése. A kezelésére alkalmazott szerek között első helyen a metronidazol, ill. tinidazol és a clindamycin áll, amelyeknek lokális és orálisan alkalmazható gyógyszerformái vannak forgalomban.

## 2. 2. Vulvovaginalis vaginitisek

A vulvovaginalis vaginitisek (Vvv) leggyakoribb kórokozói az aerob baktériumok mellett, a sarjadzó gombák, a *T. vaginalis* és az urogenitalis mycoplasmák. A Vvv-ben szenvedők hüvelyváladékának tenyésztése során az aerob baktériumok közül a *S. agalactiae*, az *E. faecalis* és az *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív pálcák izolálására kerül sor legnagyobb számban.

### 2.2.1. Sarjadzó gombák által okozott vaginitisek

A sarjadzó gombák fakultatív parazita, opportunista kórokozók, többnyire sarjadzó sejtek, álfonalak formájában kimutatható gombák. Telepeik baktériumtelepre emlékeztetnek. Kerek, sima vagy rögös felszínű, viszonylag nagy telepeket alkotnak. A normál szervezet kommenzalista lakóiként ismertek, de hajlamosító tényezők hatására patogénné válhatnak. A *Candida* genus a sarjadzó gombás betegségek leggyakoribb kórokozó csoportja. A *Candida* nemzetséget olyan fajok alkotják, melyek sejtmérete különbözik, reprodukciójuk többnyire multilaterális sarjadzással történik, álfonalaik, valódi fonalak lehetnek, karotinoid pigmentet nem tartalmaznak, egy részük képes fermentációra, mások nem. A humán patogén sarjadzó gombák közül a legnagyobb jelentőséggel a *C. albicans* bír. A genus további tagjai közül a *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* és a *C. lusitaniae* is okozhat fertőzést. Több *Candida* faj is lehet átmenetileg a normál flóra tagja. Míg csecsemőkben a sarjadzó gombák előfordulása a gyomor-bél traktusban, bőr-, és nyálkahártyák felületén 70-75%-os lehet, tünetek csak az esetek 40%-ban alakulnak ki. A sarjadzó gombák egészséges emberek bőrfelszínén 5%-os gyakorisággal fordulnak elő. A nyálkahártyák érintettsége mintegy 60%-os, a gastrointestinalis traktus 50%-ban érintett. Panasz- és tünetmentes nők hüvelyváladékában a sarjadzó gombák kimutathatósága 20 % alatt van. Az STD megbetegedésekben beszélhetünk fonalas gombák által okozott megbetegedésekről is, azonban valós jelentőséggel a sarjadzó gombák bírnak e kórképekben. A genitális mycosis leggyakoribb kórokozói a *C. albicans* (85-90%), *C. glabrata* (10-15%) és a *C. tropicalis* (10-15%) (40,62,64,116,118).

### 2. 2. 2. Sarjadzó gombák által okozott urogenitális fertőzések klinikai tünetei

Klinikai tünetek alapján a vulvovaginális candidosisok lokalizáció szerint lehetnek: vulvitis, vaginitis, vulvovaginitis, colpitis, cervicitis, urethritis. Egy másik felosztás szerint akut, krónikus vagy rekurrens forma jellemzi a betegséget. A legáltalánosabb tünetek a pruritus és a fluor, ám ezek nem csak a candidosisra jellemző tünetek. Az égő, viszkető és diszkomfort érzés akár a fájdalomig is fokozódhat, ám hasonló szubjektív panaszok előfordulnak más okok miatt is. A fluor többnyire sűrű, fehér- vagy krémszínű, „túrószerű”, de lehet híg, vizes állagú is. A hüvely falán keletkező plakkok fehér vagy krémszínűek, lehetnek pontszerűek, de nagyterjedésű, összefolyók is. A plakkok spatulával letörölhetők, ennek nyomán vérző alap marad vissza. Máskor a kisajak, a vagina erythémája, és ödémája a legjellemzőbb tünet, folyással vagy anélkül. Papulosus, ulcerált vagy granulomatosus elváltozások is tapasztalhatók. A tünetek kiterjedhetnek a combok belső felszínére is. A férfiak candidosisa alacsony prevalenciájú, a klinikai tünetek viszkető, égő és fájdalmas érzés formájában jelentkeznek (116,134).

A rekurrens krónikus fertőzés a candidosisban szenvedők 5%-ánál fordul elő. Visszatérő krónikus fertőzés okai: intestinális rezervoár, szexuális transzmisszió (férfi partnerek 20%-ában lehet kimutatni), csökkent sejt mediálta immunitás és hiperszenzitivitás *Candida* antigénekkal szemben. Genitális mycosisra hajlamosító tényezők: a terhesség, diabetes mellitus, kortikoszteroid, ösztrogén vagy antimikróbás terápia, immunológiai és daganatos megbetegedések, Cushing-kór, Addison-kór, hypo-és hyperthyreosis, szénhidrát gazdag táplálkozás, szintetikus fehérnemű és szűk farmer viselése (118).

A vizsgálati eredmények azt mutatják, hogy a kizárólag sarjadzó gomba vagy baktériumok által okozott vaginitis ritka. Ebből kifolyólag a társfertőzések nagyban befolyásolják a klinikai képet, valamint a terápiát. Terhes nőknél végzett vizsgálatok szerint a sarjadzó gombák 20%-ban fordulnak elő az endocervixben. Más vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy a BV-hez társulva 34%-ban szerepel a sarjadzó gomba társokorozóként, míg sarjadzó gombafertőzésben 24%-os gyakoriságú a patogén baktériummal való együttes előfordulásuk. A genitális mycosisok előfordulása különböző vizsgált populációban eltérő. (3. táblázat)

### 3. táblázat

#### Genitális mycosis előfordulásának gyakorisága (40,71,79,118)

Vizsgált populáció	Előfordulási százalék (%)
Szülészeti intézetek	10-25
Tünetmentes hordozó hónapokig, évekig	75
Nők életükben legalább egyszer	40-50
Visszatérő krónikus fertőzés (2-nél több)	5

#### 2.2.3. A sarjadzó gombák által okozott urogenitális infekciók laboratóriumi diagnosztikájának lehetőségei

A candidosis kimutatásának fontos feltétele a helyes mintavétel. A vatta-tamponnal a hüvely hátsó boltozatáról vett minta esetleg cervicális nyákot tartalmazhat, amelyben magasabb csíraszámban, míg a laterális falon alacsonyabb csíraszámban találhatóak a gombasejtek. A gombaelemek kimutatása fénymikroszkóppal 400-600x nagyítás mellett történik. A festett készítmények közül a metilénkék és a Papanicolaou-festés kevésbé alkalmas gomba kimutatására, mint a Gram-festés. Előbbieknél a gombasejtek hasonlóképpen festődnek, mint a velük gyakran azonos mérettartományba eső hámsejtmagvak. Tenyésztés során a szilárd táptalajokat (Sabouraud-glükóz agar, rizs agar, Casitone agar) részesítik előnyben, mivel a folyékony táptalaj használatakor a minta feldúsulhat és így kvantitatív meghatározásra nem alkalmas. Az antimycotikumokkal szemben meglevő természetes, illetve szerzett rezisztencia ismerete rendkívül fontos a célzott antimycotikus kezelés érdekében. Az öt leggyakrabban alkalmazott gombaellenes szer iránti rezisztencia típusok az alábbi 4. táblázatban láthatóak. A candidák species szintű azonosítása lehetővé teszi az empirikus antifungális terápia megkezdését.

4. táblázat

Humán patogén gombák rezisztencia típusai (10)

Rezisztencia típusa	Antimycoticumok				
	Amphotericin B	Flucytosin	Ketoconazol	Fluconazol	Itraconazol
Természetes	<i>T. beigelii</i>		<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i> <i>C. glabrata</i>	
Szerzett	<i>C. lusitaniae</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Candida spp.</i> <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>T. beigelii</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. albicans</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>

A sarjadzó gomba törzsek antifungális szerekkal szembeni in vitro érzékenységi vizsgálata ma már elengedhetetlen a rutin klinikai mikrobiológiai laboratóriumban visszatérő (rekurrens) vulvovaginitiszek esetében is.



2.3. Mycoplasmák szerepe az urogenitális infekciókban

A mycoplasmák a *Mollicutok* (sejtfal nélküli procaryoták) osztályának *Mycoplasmatales* rendjébe tartozó mikroorganizmusok. A *Mollicutok* osztályába 4 rend (*Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmataes*, *Anaeroplasmatales*) 5 család és 8 genus található. A genusok a sterol igény, a genom méret, a DNS G+C tartalom, valamint egyéb növekedési igényük szerint különböztethetők meg egymástól. Közöttük számos emberre, állatra, növényre és rovarra patogén, valamint szaprofita faj található. A *Mycoplasmatales* rendbe a *Mycoplasmataceae* család és ennek 2 genera: a *Mycoplasma* és az *Ureaplasma* tartozik. A *Mycoplasma* genusnak megközelítőleg 100 speciese ismert, ezekből mindössze 12–13, amelyeket humán anyagból izoláltak. Orvosi szempontból azonban csak 4 fajnak van jelentősége: *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. fermentans*. Az *Ureaplasma* genus 5 specieséből az *U. urealyticum* van urogenitális megbetegedésekben szerepe. Előfordulásuk helye szerint megkülönböztetünk légúti és urogenitális megbetegedést okozó fajokat (76) (5. táblázat).

5. táblázat

*Mycoplasma* és *Ureaplasma* specieseek felosztása  
kolonizáció/infekció helye, patogenitásuk szerint

Species	Előfordulás		Patogenitás
	Légutak	Urogenitális traktus	
<i>M. salivarium</i>	+	-	-
<i>M. orale</i>	+	-	-
<i>M. buccale</i>	+	-	-
<i>M. pneumoniae</i>	+	-	+
<i>M. hominis</i>	+	+	+
<i>M. fermentans</i>	+	+	+
<i>M. genitalium</i>	+/-	+	+
<i>U. urealyticum</i>	+	+	+

A mycoplasmák a legkisebb, mesterséges táptalajon tenyészthető baktériumok, amelyek nagysága 0,3–0,8  $\mu\text{m}$ , megközelítőleg a poxvírusok méretéhez állnak közel. Pleomorfak, mivel nincs merev sejtfaluk, a sejtet egy három rétegből álló membrán övezi, ennek következtében természetes rezisztenciával rendelkeznek a  $\beta$ -lactam antibiotikumok iránt, és Gram-szerint nem festhetőek. Morfológiailag a táptalaj összetételétől és a speciestől függően sokféle alakot vehet fel a kerek képletektől a filament képződéséig. A pleomorfizmus fáziskontraszt mikroszkóppal megfigyelhető. A mikroszkópos vizsgálat folyékony táptalajból sötétlátóteres, vagy fáziskontraszt mikroszkóppal lehetséges. Csillóval nem rendelkeznek, nem mozognak. Agar lemezen a telepek mérete eléri a 250–600  $\mu\text{m}$ -t, nagyítóval, esetleg szabad szemmel láthatók. Gyakran ún. tükrötjás alakot vesznek fel (kivéve *Ureaplasma*), amely egy sűrűbb sötétebb centrális és egy áttetszőbb perifériás zónából áll. A tükrötjás morfológia megjelenése species-, táptalaj-, milliő- és inokulumfüggő. Spórát, tokot nem képeznek. Aerob, ill. fakultatív anaerob baktériumok, optimális növekedési hőmérsékletük 35–38 °C. Szobahőn néhány óra alatt elpusztulnak, de –20°C-on hónapokig eltarthatóak. A táptalaj optimális pH-ja 7,0 és 7,8 között van, speciesenként változó, kivétel az *Ureaplasma*, amely a savanyú pH=6 értéken növekszik. A mycoplasmák tápigényes mikroorganizmusok. Növekedésükhöz sterolt, nukleinsav prekurzorokat igényelnek. Egyes fajok glukózt, vagy arginint, mások (ureaplasmák) az ureumot képesek felhasználni növekedésükhöz (12,69,76,85).

### 2. 3. 1. Az urogenitális mycoplasma fertőzések klinikai kórképei

Az urogenitális szervek gyulladásos folyamataiból izolált mycoplasmák kórokozó szerepét több szerző alátámasztotta, jóllehet ezek a speciestek (*M. hominis*, *M. fermentans*, *M. genitalium*) előfordulhatnak egészségesek orr-garatüregében és panasztünetmentesek urogenitális traktusában (125). A kismencedei gyulladás, colpitis, fluor, spontán abortusz, idő előtti burokrepedés, koraszülés, gyermekágyi láz (9,13,80,94,109), neonatális dystrophia és meningitis, agytályog, szepszis (68), urethritis, prostatitis eseteiben a mycoplasmák kórokozó szerepe bizonyított. A mycoplasmák-ureaplasmák szerepet játszanak a krónikus vagy recidiváló atípusos gyulladásos folyamatokban, női-férfi meddőségben (16,125). Ez részben a korábbi gyulladások révén, részben közvetlenül az ivarsejtekre gyakorolt káros hatás következménye lehet. A mycoplasmák

ellenállóképessége sokkal kisebb, mint általában a baktériumoké. Természetes rezisztenciával rendelkeznek a penicillinekkal és a cephalosporinokkal szemben. Ellenállóak a talliumacetáttal, amphotericin B-vel szemben is. Ezt a tulajdonságát használják fel a táptalajok szelektivitásának fokozására. Az antibiotikum érzékenységi vizsgálatok agarhígításos, anyagcseregátló módszerrel végezhetők el. A *M. fermentans* és a *M. hominis* a makrolidekre rezisztensek. A fluoroquinolonok és a tetracyclinek iránti érzékenységük alapján elsőként választandó szerek az urogenitális traktus mycoplasma fertőzései esetén. Az utóbbi évek nemzetközi felmérései szerint csökken a tetracyclinek iránti érzékenysége a törzseknek. Az ureaplaszmáknak természetes rezisztenciájuk van a fluoroquinolonok iránt, csak a makrolidokra és a tetracyclin származékokra mutatnak érzékenységet (69,107,111). (6. táblázat)

## 6. táblázat

### Urogenitális infekciót okozó mycoplasmák antibiotikum érzékenysége

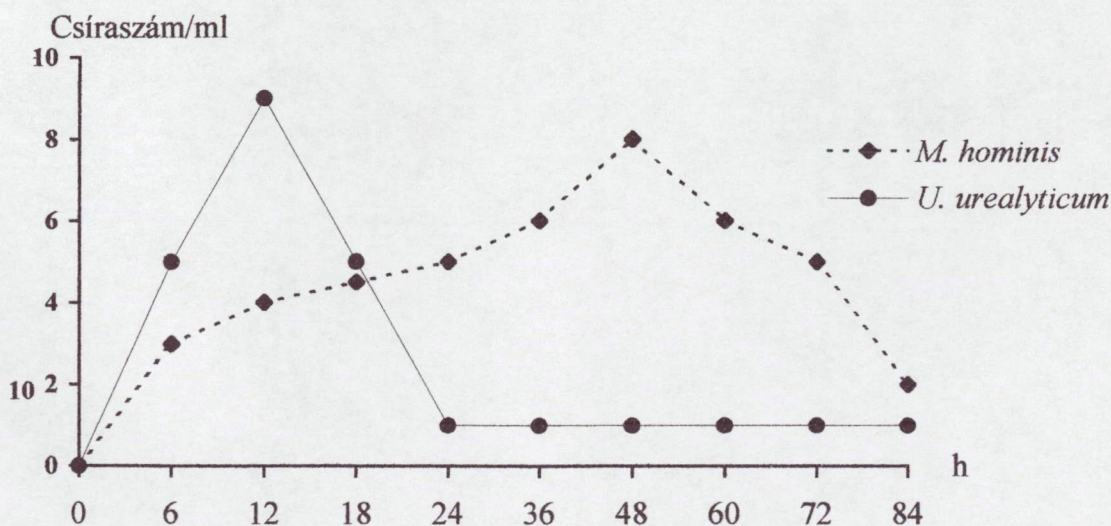
Antibiotikum	<i>M. hominis</i>	<i>M. fermentans</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>U. urealyticum</i>
Erythromycin	R	R	É	É
Clarythromycin	R	É	É	É
Azithromycin	R	R	É	É
Tetracyclin	É	É	É	É
Ofloxacin	É	É	É	R
Ciprofloxacin	É	É	É	R
Clindamycin	É	É	M	R

É=MIC < 1µg/ml, M= 1-10µg/ml, R=>10µg/ml

### 2.3.2. Az urogenitális mycoplasmák és ureaplasmák kimutatásának laboratóriumi lehetőségei

A *M. hominis* és az *U. urealyticum* tenyésztése a folyékony, komplett U9, A7 táptalajokban egyidejűleg történhet. Az klasszikus BEA, BEG, HIA táptalajokon a *M. hominis*, és a *M. fermentans* is tenészhető. Az *U. urealyticum* tenyésztésére nem alkalmasak ezek a táptalajok, csak az U-9 leves, a *M. genitalium* tenyésztésére az SP-4 leves. A vizsgálati minta leoltása az U-9, folyékony táptalajba cseppegtve (4-5 csepp Pasteur pipettával), ill. belemosva a tampon, szemikvantitatív meghatározás céljából, kalibrált kacsnyi mennyiséget az A-7 vagy HIA agarlemezre csorgatva történik (65,113). Az agarlemezre leoltott minták növekedését telepmikroszkóp alatt naponta vizsgálva, ill. *M. hominis* irányában a BEA levestől 48 óránként, az *U. urealyticum* irányú vizsgálat esetén 5 napon át naponta szubkultúrát kell készíteni az 1. ábrán látható szaporodási ciklus különbsége miatt.

***M. hominis* és *U. urealyticum* tenyészetek  
csíraszám növekedése**



1. ábra

A telepek az agarba ágyazódva ún. tükörtojásszerű formában nőnek, de a perifériás zóna gyakran hiányzik. Az első leoltást követően a folyékony táptalajokat 5 % CO<sub>2</sub> tartalmú termosztátba helyeztük. A HIA, A-7 agarlemezek az 5 % CO<sub>2</sub> termosztátba nedveskamrába kerültek. A Mycoplasma duo gyári teszt, amelynek segítségével 48 óra után csíraszám meghatározással, a *M. hominis* és *U. urealyticum* jelenléte a vizsgálati anyagmintában diagnosztizálható.

## 2. 4. Trichomonosis

A trichomonosis kórokozója a *Trichomonas vaginalis*, a *Flagellata* rendbe tartozó, centrális maggal és négy szabad ostorral rendelkező körte alakú, 5-20 µm átlagos nagyságú anaerob protozoon parazita. Az ötödik ostort unduláló hártya köti a testhez.

### 2.4.1. A trichomonosis klinikai tünetei

Trichomonosisban a nők fertőzöttsége gyakran tünetmentes. Jellegzetes klinikai tünete a bőséges, sárgás-zöldes, híg, habos, émelyítő szagú váladék ürülése a gyulladt hüvelyből. Ehhez társul a külső nemi szervek területén égő érzés és viszketés, valamint fájdalmas vizeletürítés. A hüvelyfal gyulladását, amely a betegségben szenvedők 20-75%-ában jelentkezik, az ún. „strawberry spots”-ok jellemzik (Kolpitis granularis). A férfiak fertőzöttsége rendszerint tünetmentes, ők a fertőzés rezervoárjai. A trichomonosis jellegzetes kórképei a cystitis, dysuria, dyspareunia, férfiakban urethritis és prostatitis (40,55,62,100).

Az utóbbi időben csökkent a *T. vaginalis* által okozott fertőzések gyakorisága.

A transzmisszió típusos STD transzmissziós ráta férfiaktól → nők irányába 85%, nőktől → férfiak irányába történő átadás esetén 70%-os. A kolonizáltak 50%-a mindkét nem esetében tünetmentes lehet.

## 7. táblázat

**Trichomonosis urogenitális**  
**előfordulásának gyakorisága (100,118)**

<b>Vizsgált populáció</b>	<b>Előfordulás százalék (%)</b>
Tünetmentes hordozók (nők)	20
Családtervezési intézetek	5-10
STD-klinikák	30-40
Prostituáltak	50-75

#### 2.4.2. A trichomonosis laboratóriumi diagnosztikájának lehetőségei

Trichomonosis meghatározására a natív kenet („Wet mount”, érzékenysége 60-80%-os) a festett kenet (Giemsa, Papanicolaou) és különböző folyékony táptalajban (CPLM, Szenes) történő tenyésztési eljárásokat alkalmaznak rutinszerűen (55,100). Legmegbízhatóbb eljárás az élő, jellegzetes mozgással rendelkező kórokozó mikroszkópos kimutatása a tenyésztés után. A hibridizációs próbával történő kimutatás gyors módszer, amely a tenyésztéssel történő meghatározás érzékenységét nem éri el, mivel csak meghatározott csíraszám ( $10^3$  CFU/minta felett ad pozitív eredményt, a tenyésztéssel szemben, amelynél egyetlen élő *T. vaginalis* jelenléte esetén az eredmény pozitív (7, 18). A trichomonosis kezelésére metronidazol ill. a tinidazol a választandó antimikrobás szer.

## II. CÉLKITŰZÉSEK

Az urogenitális szervek néhány kiemelten fontos kórokozója szexuális úton is terjedhet. A klinikai mikrobiológiai diagnosztika fejlődése során e kórokozók kimutatására is új módszerek kerültek bevezetésre. A gyors, korszerű mikrobiológiai és molekulárbiológiai módszerek bevezetése a rutin diagnosztikába, a hagyományos tenyésztésen alapuló módszerekkel való összehasonlításukat nem mellőzheti. Célul tűztem ki tehát, annak az összehasonlító vizsgálatát, hogy a hagyományos és modern mikrobiológiai eljárások, hogyan alkalmazhatóak a az STD megbetegedések diagnosztikájában.

1. A bakteriális vaginózis laboratóriumi diagnosztikája az igényes anaerob baktériumok tenyésztése, azonosítása miatt a rutin mikrobiológiai laboratóriumokban nem terjedt el. Célul tűztem ki: egészséges és vulvovaginális vaginitisben szenvedő nők hüvelyváladékának komplett tenyésztéses vizsgálatát aerob, anaerob, gomba, mycoplasma, ureaplasma, trichomonosis irányában. A hüvelyváladékok Gram-szerint festett kenetének vizsgálati eredményét összehasonlítottam a tenyésztési vizsgálatok eredményeivel. Nőknél az urogenitális szervek gyulladásos folyamataiban kockázati tényezőt jelent az intrauterin eszköz (IUD) alkalmazása. Így munkám célja volt továbbá, hogy az STD kórokozók biofilm képzését is vizsgáljam egy kettős fluoreszcens festési eljárással, és confocalis laser scanning mikroszkóppal detektáljam.
2. Az urogenitális mintákból izolált sarjadzó gomba törzsek species szintű azonosításának terápiás jelentősége van. A sarjadzó gombák érzékenysége a bakteriológiában hagyománnyá vált Kirby-Bauer korongdiffúziós próbával nem megbízható, így célul tűztem ki az általam izolált törzsek közül a *C. albicans* mellett a rezisztencia problémákat okozó egyéb sarjadzó gombák, mint a *C. krusei* és a *C. glabrata* törzsek antifungális szerek iránti érzékenységének meghatározását. A minimális gátló koncentráció meghatározására (MIC) mikro-leves hígítási módszert és E teszt alkalmazását választottam.



3. A *M. hominis* és az *U. urealyticum* nehezen tenyésztethető kórokozók, amelyek az elsődlegesen atípusos kórfolyamatokban játszott szerepük mellett a szövődmenyként létrejövő krónikus nőgyógyászati, urológiai és andrológiai megbetegedésekben jelentenek különösen nagy gondot. A *M. hominis* és *U. urealyticum* kimutatása hagyományos tenyésztési eljárásokkal 21 napot vehet igénybe. Speciális, gyors diagnosztikai eljárással ez az idő 48 órára csökkenthető. A tenyésztési vizsgálatok mellett e kórokozóknak az érzékenységi vizsgálatai nehezen kivitelezhetőek, nem a rutin laboratóriumok tevékenységei. A hagyományos tenyésztési eljárással izolált *M. hominis* és *U. urealyticum* törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározására a mikro-leves hígítási módszerrel és E teszttel végzett pontos MIC érték meghatározást tűztem ki célul.
4. Az urogenitális szervek kórokozóinak modern molekulárbiológiai módszerekkel történő kimutatása nem terjedt el széles körben. Hibridizációs próbával a *Candida* speciesek, a *T. vaginalis* és a BV egyik kórokozója a *G. vaginalis* mutatható ki. A *M. genitalium* tenyésztése rendkívül nehézkes, hosszadalmas eljárás, így célul tűztem ki a kórokozó PCR-el történő kimutatását. A *M. genitalium* referencia törzsszel a módszer érzékenységére kalibrációs vizsgálatokat, majd infertilitás miatt vizsgált férfi betegek mintáiból PCR vizsgálatot végeztem.



### III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

#### 1. Mintavétel

A vizsgálati anyagok mintavételét klinikusok a Szegedi Tudományegyetem, ÁOK, Urológiai, Szülészeti és Nőgyógyászati és Bőrgyógyászati Klinika STD ambulanciáján végezték az előírásoknak megfelelően. Nőbetegeknél kolposzkópos feltárást követően a Stuart-féle szemiszolid transzport közeghez tartozó mintavevő tamponnal a hüvely hátsó boltozatáról, míg férfiaknál a húgycsőből történt a tamponos mintavétel.

#### 2. Referencia törzsek:

*M. hominis* PG-21 (származása: Mardh P-A. Uppsala Svédország)

*M. genitalium* G-37 (származása: Jensen JS : Koppenhága, Dánia)

*U. urealyticum* T-960 (I-VIII.) (származása: Mardh P-A. Uppsala Svédország)

*Candida albicans* ATCC 14053,

*Candida krusei* ATCC 6258,

*Candida glabrata* ATCC 39316,

*Candida tropicalis* ATCC 4563

#### 3. Tenyésztési eljárások

##### 3.1. Aerob baktériumok tenyésztése

A laboratóriumba érkezett vizsgálati mintákat 5% marhavért tartalmazó véres agartáptalajon, főtt-marhavért tartalmazó csokoládé agartáptalajon, módosított Thayer-Martin (TM) és eozin-metilénkék agartáptalajra oltottuk. A véres, csokoládé és TM agarlemezeket 5%-os CO<sub>2</sub>-t tartalmazó termosztátban 37 °C-on, 24 ill. 48 óráig, az eozin-metilénkék agarlemezeket 37°C-on 24 óráig inkubáltuk. Huszonnégy óra után a kitenyészett baktériumokat azonosítottuk és meghatároztuk az antibiotikum érzékenységüket. Azokat a lemezeket, amelyeken normál baktérium flóra növekedése

volt csak látható, további 24 órára visszahelyeztük 5% CO<sub>2</sub> termosztátba 37°C-ra és így 48 óra inkubálás után adtunk ki végleges tenyésztési eredményt (55).

### 3.2. Bakteriális vaginózis irányú vizsgálatok

A BV gyanúja esetén a klinikus által levett hüvelyváladék tárgylemezen fixált kenetét Gram-szerint megfestettük, majd fénymikroszkóppal 400x nagyítással vizsgáltuk.

A BV-re jellemző vegyes anaerob flóra tenyésztése céljából a tamponos minták leoltása Columbia alapú (bioMerieux) heminnel és K<sub>1</sub> vitaminnal komplettált anaerob véres agarlemezre és 5%-os humán vér tartalmú agarlemezre történt. A két lemezre leoltott minták inkubálására anaerosztátban került sor 37 °C-on 5 napon át. Az inkubálás után a lemezek értékelése az aerob leletek birtokában történt meg. A vegyes anaerob flórát alkotó baktériumokat identifikáltuk species ill. genus szinten (55,65,122).

Az IUD eszközök tenyésztése Holman-levesben történő vortexelést követően valamennyi aerob és anaerob baktériumok, sarjadzó gombák, mycoplasmák és ureaplasmák irányában megtörtént. Az IUD-n képződött bakteriális-gomba eredetű biofilm kimutatására kettős festési eljárást követően CLSM vizsgálatot végeztünk. Miután a festést élő kultúrán végeztük, a különböző aktív mechanizmusok befolyásolhatják a festék(ek) bejutását az élő baktériumsejtekbe. A vastag biofilm réteg nemcsak az antibiotikumok behatásától védi meg a baktériumsejteket, hanem más nagy molekulású vegyületek is nehezen juthatnak el a baktérium sejtekig. A kettős festést azt a célt szolgálja, hogy egyidőben, de eltérő színnel láthatóvá tegyük mind a baktériumsejteket, mind pedig az azokat körülvevő biofilmet is. A kettős festést FITC-el jelölt concanavalin A-val és O-safranin-nal végeztük el. Az IUD darabkákat tárgylemezre helyezük és 20 percig a FITC-el jelölt concanavalin A-val festettük. A festék leöblítése után 1-2 percre O-safranint-t rétegeztünk rá. A nedvesség legnagyobb részét leitatjuk, majd UV fényben, 400x ill. 1000x nagyítással vizsgáltuk. A baktérium, gomba sejtek piros színűen, a biofilm pedig zöld színben jelenik meg (138). A CLSM technika a biofilmről térhatású felvételek készítését teszi lehetővé, amely jobban szemléltette a különböző rétegek baktérium-biofilm arányát.

A CLSM a fényforrásból kiinduló fényt a dikroitikus tükör vetíti a vizsgálandó mintákra. A lézer-csúcsfény nyaláb végigpásztáz egy síkot, így készít optikai metszetet a vizsgált

mintáról. A detektorba érkező fény impulzussorozattá alakul, majd számítógépes feldolgozás után digitális képet kapunk. A képek megfelelnek a minta egy-egy optikai metszetének. A mikroszkóp fókusza több síkba is beállítható, így optikai metszetsor készíthető. Az egyes metszetek vastagsága a fotodetektor előtti csapnyílás átmérőjének változtatásával állítható be. Ezzel szabályozható, hogy a kapu a fókusz mekkora környezetéből enged be fényt a detektorra. A mikroszkóp optikai rendszere kombinálja a hagyományos fluoreszcens mikroszkópot és a konfokalitást (azonos fókuszosság). A mikroszkóp pontról-pontra vizsgálja a mintát, így a kontrasztosság és a részletgazdagság jelentősen megnő a hagyományos fluoreszcens mikroszkóphoz képest. A mikroszkópban a fényforrás és a fénydetektor csapnyílásai azonos fókusz távolságra vannak. A tárgyasztal működése úgy is programozható, hogy az adott mintáról ne csak egy optikai metszet, hanem egész sorozat készüljön. Metszetsorozat készítés esetén elkészíthető az úgynevezett fúziós három dimenziós kép, amely a vizsgált minta térbeli szerkezetére enged következtetni. Különböző fényszűrők használatával, az alkalmazott festési eljárásokkal, figyelembe véve a festékek metakromáziás tulajdonságát (8. táblázat), 12 szín megjelenítésével megközelítőleg ultrastrukturális vizsgálatokat végezhetünk. A nyert kép digitális. Egy vizsgálati mintából teljes metszetsorozat készült.

#### 8. táblázat

##### Fluorokrómok spektruma (67)

Fluorokrom	Hullámhossz (nm)	
	Excitáció	Emisszió
FITC-concanavalin-A	490	520
O-safranine	530	590



#### 4. Sarjadzó gombák kimutatásának lehetőségei

A vizsgálati anyagokat gomba irányú tenyésztés céljából Sabouraud-agarra szélesztettük, majd 35°C-on 24 óráig, majd további 4 napon át szobahőmérsékleten inkubáltuk (5,55,115).

##### 4.1. Sarjadzó gombák azonosítása

A mikroszkópos vizsgálat során gombaelemek közvetlen kimutatása fénymikroszkóppal történt 400-600x-os nagyítás mellett. A natív fiziológiás sóoldattal készített preparátumot fáziskontraszt mikroszkóppal értékeltük. Festett készítményként a metilénkéses és Papanicolau-festés kevésbé alkalmasak a gombasejtek kimutatására, a közel azonos méretű hámsejtek magjainak hasonló festődése miatt. A sarjadzó gombák Gram-szerint pozitívan festődnek.

A csíratömlő vizsgálata GT „germ tube” próba: Az identifikálási lehetőségek közül a *Candida albicans* meghatározására a legegyszerűbb módszer. Ezzel az eljárással a *Candida albicans* törzsek 85-95 %-át lehet 3-4 órán belül azonosítani primokultúrából vagy tisztított izolátumból. A fals negatív eredmények elérik a 10%-ot, ami abból adódik, hogy az álfonal képzés korai szakasza hasonlít a csíratömlőre.

A chlamydospóra képzés vizsgálata során a *C. albicans* rizskeményítő tartalmú közegben, oxigénszegény környezetben jellegzetes alakú képleteket hoz létre. A teszt a *C. albicans* törzseket 95-98 %-os biztonsággal mutatja ki.

A klasszikus asszimilációs-fermentációs próbák a nem *C. albicans*-nak bizonyuló sarjadzó gomba törzsek további azonosítására alkalmas módszer.

Kereskedelmi forgalomból beszerezhető kitek a klasszikus asszimilációs-fermentációs próbán alapulnak. (Fungiscreen-Bio-Rad, korábban Sanofi Diagnostics Pasteur, ATB 32 C, API 20 AUX bioMerieux)

A ChromAgar *Candida* (Becton Dickinson) kereskedelmi forgalomban megvásárolható kész agarlemez formában. A szelektív, differenciáló táptalaj, amelyben a Gram-pozitív, valamint a Gram-negatív baktériumok növekedése gátolt. Differenciáló hatása a benne lévő négy különböző színű kromogén szubsztrát révén biztosított, amelyek a négy leggyakrabban előforduló humán patogén *Candida* species telepeinek különböző szint

adnak. A Sabouraud agaron kitenyésztett sarjadzó gombák jellegzetes telepeit ChromAgar-ra szélesztve 24-48 órán át 35 °C-on történő inkubálást követően az izolátumok jellegzetes színük alapján azonosíthatóak. A *C. albicans* telepek kékes-zöld, a *C. krusei* rózsaszínű, hópehelyszerű, a *C. glabrata* ciklámen és a *C. tropicalis* szürkés-kék színű telepekként növekednek (89,98).

#### 4.2. Sarjadzó gombák antifungális szerek iránti érzékenységeinek meghatározása

A sarjadzó gombák antimycoticum érzékenységeinek meghatározása nem terjedt el széles körben a hazai laboratóriumokban. Az amerikai rutin mikrobiológiai laboratóriumoknak is mindössze 3%-a végez az NCCLS által javasolt módon (87) antimycoticum érzékenység meghatározást.

**Makro-leveshígítási módszer** alkalmazásakor a Sabouraud agarról izolált referencia sarjadzó gomba törzsek 24-48 órás tenyészetéből 0,5 McFarland-sűrűségű szuszpenziót készítettünk RPMI-1640 levesben, majd ennek 1:100 hígításából, 1:20 arányban további hígítást készítettünk. Az így elkészített szuszpenzió 0,9 ml-nyi mennyisége került a 9 ml RPMI 1640. leveshez. Az antifungális szerek törzsoldatait frissen készítettük el 2560 µg/ml töménységben. Az 5 fluorocytosint (5FC) steril desztillált vízben a többi antifungális szert 100% DMSO-ban (dimethyl sulphoxide) oldottuk fel. A továbbiakban használt felező léptékű munkahígítások az RPMI-1640 levesben készültek. A MIC meghatározáshoz az antifungális szerek kívánt hígításainak (64 µg/ml-0,125 µg/ml) százszoros koncentrációjából 0,1 ml-t mértünk be a sarjadzó gomba tenyészetet tartalmazó leves tenyészethez. Minden alkalommal sarjadzó gomba ill. antimycoticum mentes kontrollokat is beállítottunk.

Az **E teszt** (AB Biodisc Svédország) csíkok egy preformált koncentráció gradiens formájában tartalmazzák a gomba ellenes szereket. Technikailag egyszerű, gyorsan kivitelezhető módszer. Az E teszttel pontosan leolvasható a MIC érték, a módszer alkalmas akár egyetlen gomba ellenes szer érzékenységeinek a meghatározására. A Sabouraud agarról izolált sarjadzó gomba törzsek 24-48 órás tenyészetéből 0,5 McFarland-sűrűségű szuszpenziót készítettünk 0,85% NaCl oldatban. A laboratóriumokban a sarjadzó gomba tenyésztésre rutinszerűen alkalmazott Sabouraud agar nem alkalmas a gomba ellenes szerek E teszttel történő vizsgálatára. A természetes

agar táptalajba az antifungális szerek diffúziója nem megfelelő így nincs éles gátlási zóna, hanem a zónán belül további gombatelepek láthatók. A mintákat vattatamponnal rétegeztük az azol típusú antifungális szert tartalmazó E tesztek vizsgálatakor RPMI+2% glukóz+MOPS (3-[N-morpholino-] propane sulfonic acid) agar felületére (14, 15).

A 35 °C-on inkubált lemezeket 24-48 óra után értékeltük. Az antifungális szerek közül az amphotericin B (Bristol-Myers Squibb), 5-flucytosine (5FC) (Roche), fluconazole (Pfizer), ketoconazole és itraconazole (Janssen-Cilag) érzékenységét határoztuk meg.

Az E teszt csíkokra az antimycotikumokat a következő hígítási tartományban voltak adszorbeálva: a ketoconazole és itraconazole: 0,002-32 µg/ml, az amphotericin B: 0,002-32 µg/ml, a fluconazole 0,016-256 µg/ml, az 5-FC 0,012-32 µg/ml. A tesztcsíkok tárolása a felhasználásig -20°C-on történt a gyártó előírása szerint (30).

A **Fungitest** (Sanofi Diagnostics Pasteur) mikrodilúciós módszeren alapuló vizsgálo eljárás RPMI 1640 levest tartalmazó mikrotitráló műanyag lemezben. A dehidrált pufferolt táptalaj hat antimycoticum két hígítását tartalmazza. Az 5 fluorocytosin 2-32 µg/ml, amphotericin B 2-8 µg/ml, miconazol 0,5-8 µg/ml, ketoconazol 0,5-4 µg/ml, itraconazol 0,4-4 µg/ml, és a fluconazol 8-64 µg/ml hígításait. A tápfolyadék színes indikátort tartalmaz, amely kék színről-rózsaszínre változása jelzi a gombák növekedését (85,102).

A **BIOMIC Video System** (Giles Scientific, Inc. New York) érzékenység meghatározása a hagyományos korongdiffúziós módszeren alapul. A BIOMIC Video System-el sarjadzó gomba törzsek fluconazol érzékenység meghatározását végeztük. Mueller-Hinton táptalaj 2%-os glukózzal és 5 µg/ml metilénkéssel kiegészített agar lemezén a rezisztencia leolvasását a videokamera által felvett képből történik, amely a fluconazol által a vizsgált törzsre gyakorolt 80%-os növekedésgátlás határának meghatározásán alapul. A hagyományos Mueller-Hinton agaron végezve az érzékenységi vizsgálatot a gátlási zónán belül apró sarjadzó gombatelepek növekedtek. A módosított Mueller-Hinton táptalajon, ill. az E teszthez használt RPMI 1640 agaron a gátlási zónán belül (a 80%-os növekedésgátlást figyelembe véve) növekedés nincs. Ericsson és Sherris 1971-ben a korongdiffúziós gátlási zóna értékéből lineáris regressziós analízissel MIC értéket határoztak meg. A BIOMIC Windows alatt futó expert programja ezen az elven alapulva, a gátlási zóna átmérő leolvasását követően, a fluconazol MIC értékét is megadja a

vizsgált sarjadzó gomba esetében (6). Az epidemiológiai program lehetővé tette a kórokozók előfordulásának részletes, több szempont szerinti elemzését.

## 5. *M. hominis* és *U. urealyticum* kimutatás lehetőségei

### 5.1. Mycoplasmák tenyésztése, azonosítása

A mycoplasmák tenyésztése nem könnyű feladat. Speciális táptalajokon hosszadalmas tenyésztéssel izolálhatóak. A *M. hominis* és az *U. urealyticum* tenyésztése a komplett U9, A7 táptalajokban egyidejűleg történik. A klasszikus BEA, BEG, HIA táptalajokban a *M. hominis*, és a *M. fermentans* is tenyészthető. Az *U. urealyticum* tenyésztésére az U-9 leves, a *M. genitalium* tenyésztésére az SP-4 leves alkalmas (76,113). A folyékony vizsgálati mintát (ejakulátum, EPS) az U-9 folyékony táptalajba csepegtettük (4-5 csepp, Pasteur pipettával), ill. a tamponos mintát belemostuk a folyékony táptalajba, majd a szemikvantitatív meghatározás céljából, kalibrált kacsnyi mennyiséget az A-7 vagy HIA agarlemezre csorgattunk. A szilárd (HIA) agarra történő leoltás steril pipetta, vagy kalibrált kacs segítségével történt úgy, hogy a folyadék az agar felszínén egy csíkban végigcsorogott. A folyékony BEA (2 ml) táptalajba a vizsgálati anyag 0,2-0,2 ml-e került. A vizelet feldolgozása a minta mennyiségétől függően történt. Amennyiben kevés minta érkezett (<3 ml), a vizsgálati anyagból 5-6 cseppet Pasteur pipettával a folyékony táptalajba juttattunk U-9 (vagy BEA, BEG), majd A-7/HIA lemezre, kicsorgattuk. Elegendő mennyiségű vizelet (>3 ml) esetén: 1500 rpm, 20 percig centrifugáltuk, majd az üledékből, leoltottunk az előzőekben ismertetett módon. Az első leoltást követően a folyékony táptalajokat 5% CO<sub>2</sub> tartalmú termosztátba helyeztük. A HIA, A-7 agarlemezeket az 5 % CO<sub>2</sub> termosztátba nedveskamrába kerültek. A tenyészeteket telepmikroszkóppal naponta vizsgáltuk és a *M. hominis* irányában a BEA levestől 48 óránként, az *U. urealyticum* irányú vizsgálat esetén, az U-9 folyékony táptalajból 5 naponta kicsorgatást végeztünk. A folyékony U-9 leves alkalmas az ureaplaszmák ureáz enzimtermelésének igazolására, amelyet a csíraszám függvényében 18-36 óra után a táptalaj eredeti világos sárga színének, zavarosodás nélküli-ciklámenre változása jelez. A BEA és BEG táptalajok színváltozásukkal jelzik a szaporodó mycoplasmák jelenlétében bekövetkező pH változást. Ugyanezen folyékony táptalajok gyári kittekben is rendelkezésre állnak (101). A telepmikroszkóp alatt a jellegzetes fehér színű, tükrötőjásra

emlékeztető mycoplasma és az apróbb, a táptalajban lévő  $\text{MnSO}_4$ -ból a mangán inkorporáció révén fekete színű ureaplasma telepek megjelenése esetén blokk kivágással szubkultúrát készítünk, a megfelelő folyékony leves táptalajokban. A szubkultúra alkalmas 24-48 óra után biokémiai azonosításra (arginin hidrolizálása, a glukóz bontása és ureáz enzim aktivitás), szükség esetén antibiotikum érzékenység meghatározására. A szerológiai azonosítás meglehetősen megbízható módszer a biokémiai próbák kiegészítésére (20,65,76,113).

## 5.2. Mycoplasmák antibiotikum érzékenységének meghatározása

A mycoplasmák szaporodását folyékony táptalajokban a baktériumoktól eltérően nem kíséri zavarosodás. A táptalajban levő indikátor, a növekvő mycoplasmák anyagcseretermékeinek következtében kialakuló pH változást jelzi. A táptalajok eredeti színének árnyalatnyi változása is már magas csíraszámot takarhat. ( $>10^{4-5}$  CFU/ml) A 8-48 órás leves tenyészetek alkalmasak az antibiotikum érzékenység meghatározására.

**Mikro-leveshígítási módszerrel** 96-lyukú mikrotitráló lemezben végeztük a meghatározást. Az U-9 levesben (Bio-Rad, Hungary) előtenyésztett mycoplasmák erythromycin (Abbott, USA), azithromycin (Pliva-Chinoin, Hungary), doxycyclin (Chinoin, Hungary), ofloxacin (Hoechst, Hungary) és ciprofloxacin (Bayer, Hungary) antibiotikumok iránti érzékenységét vizsgáltuk meg. Az 512  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációban 0,1 M foszfát-pufferben (pH 6,8) elkészített törzsoldatokból 256  $\mu\text{g/ml}$ -től 0,125  $\mu\text{g/ml}$ -ig készítettük el, minden antibiotikum esetében a hígítási sort. A  $-70^\circ\text{C}$ -on fagyaszttva tárolt *M. hominis* és *U. urealyticum* referencia törzseket, valamint a klinikai izolátumokat friss U-9 táptalajban inkubáltuk 24 órán át  $37^\circ\text{C}$ -on 5%  $\text{CO}_2$ -ot tartalmazó termosztátban. 200  $\mu\text{l}$ -nyi  $10^4$  CFU/ml tenyészetet pipettáztunk a mikrotitráló lemez mélyedéseibe. A MIC leolvasása a táptalajok színváltozását figyelembe véve leghamarabb 18 órai inkubáció után történt (63,85,88,95,108,112,137).

E tesztet végezve a mycoplasma/ureaplasma törzsek antibiotikum érzékenység meghatározását A7 agar táptalajt használtunk. (Bio-Rad, Hungary) Az A7 agar differenciáló agartáptalaj, amelyen a *M. hominis* és az *U. urealyticum* egyidejű tenyésztésére alkalmas. 100  $\mu\text{l}$  mintát, amely megegyezett a mikro leves hígítási

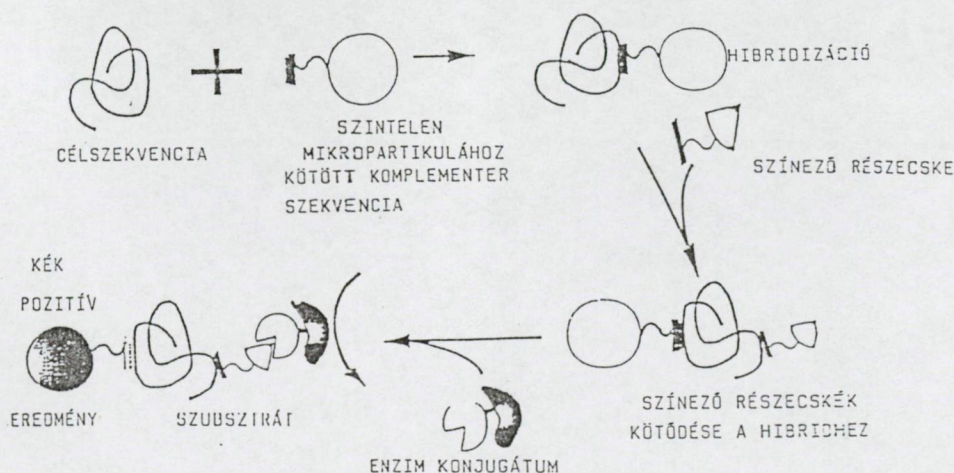


módszer során alkalmazott tenyésztettel az A7 agarlemez felszínére rétegeztünk. Az erythromycin, azithromycin, doxycyclin, ofloxacin és ciprofloxacin tartalmú E teszt csíkokat az agar lemezre helyeztük. A tenyészetek inkubálását 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalmú termosztátban végeztük. A pontos MIC érték leolvasása az inkubálás 2-4 napján történt, a *M. hominis* és *U. urealyticum* törzsek növekedésétől függően. Az elipszoid zóna leolvasását telepmikroszkóp alatt 100x nagyítással végeztük.

## 6. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása egyes STD kórokozók diagnosztikájában

### 6.1. Urogenitális kórokozók kimutatása tenyésztéssel és génpróbával

A nőgyógyászati gyakorlatban a Vvv leggyakoribb kórokozóinak, a *Candida* speciesek, a *T. vaginalis* és a BV egyik leggyakoribb kísérőjének a *G. vaginalis*-nak DNS hibridizációs technikával történő kimutatása közvetlenül a hüvelyváladék egyetlen tamponos mintájából történt. A PAC (Probe Analysis Card) pozitív, negatív kontrollok mellett a *G. vaginalis*, a *Candida* speciesek és a *T. vaginalis* egyszálú DNS-ével fedett golyócskákat tartalmazza, amelyek a vizsgálati anyagból az előkezelés során jelenlévő szintén egyszálú DNS-sel történő hibridizációra nyújt lehetőséget (7,133) Minden esetben párhuzamosan a klasszikus tenyésztési eljárásokat is elvégeztük.



2. ábra

DNS hibridizáción alapuló teszt elve

## 6.2. *M. genitalium* kimutatása PCR módszerrel

Vizsgálatainkhoz az SP-4 médiumban szaporított és szállított *M. genitalium* G-37 referencia törzset használtuk (pozitív kontrollként), amelyet Jensen J.S. koppenhágai kollégánk bocsátott rendelkezésünkre, aki elsőként foglalkozott a fent említett kórokozó PCR módszerrel történő kidolgozásával (57,58,59).

Az elővizsgálatok során a *M. genitalium* referencia törzs előkezelt mintáiból izolált DNS-t használtuk a módszer beállításához. A kvalitatív vizsgálatokat kvantitatív vizsgálatok követték, amelyek során választ szerettünk volna kapni, milyen hozzávetőleges csíraszám esetén kapunk a PCR-el pozitív eredményt. A kvalitatív vizsgálat beállításához a tömény referencia *M. genitalium* törzset ( $10^8$  CFU/ml) használtuk pozitív kontrollként, míg negatív kontrollnak deionizált vizet, illetve *M. genitalium* PCR vizsgálattal negatív klinikai mintákat használtunk. Kvantitatív vizsgálatainkhoz a tömény *M. genitalium* törzs ultratisztaságú deionizált vízben készített tízes léptékű hígításait mértük a PCR elegybe.

Aerob és anaerob tenyésztéssel, *T. vaginalis* és *C. trachomatis*, *M. hominis* és *U. urealyticum* negatív és pozitív 5-5 klinikai mintához kevertük a referencia törzset és végeztük el a kimutatást, miután előzetesen ezek is negatív *M. genitalium* PCR eredményt mutattak és így alkalmasnak bizonyultak a *M. genitalium* DNS-sel való „megtüzelésre” (11,59,52,53,54).

A klinikai vizsgálatok elvégzéséhez a mintákat válogattuk, a válogatás szempontjai a következők voltak: elsősorban olyan páciensek mintáját dolgoztunk fel, akiknél a klinikai tünetek háttérében potenciálisan BV, *T. vaginalis*, *Candida* fertőzés lehetett. A klinikai mintákban, esetlegesen jelenlévő inhibitorok jelenlétének igazolására vizsgálatot végeztünk. A gátló anyag "internal control" (IC) kimutathatósága kizáró tényező volt a további PCR vizsgálatokhoz. Így az IC kimutatásával lehetővé vált a potenciálisan hamis-negatív eredmények előzetes kiszűrése, az általunk beállított *M. genitalium* PCR házilag vizsgálatok során. Az urogenitális szervekből származó klinikai minták transzport táptalajban érkeztek a laboratóriumba (COBAS AMPLICOR *C. trachomatis* teszt transzport médium), mely lehetővé tette a minták azonnali lizálását is. Feldolgozásig a vizsgálati anyagokat -20°C-on tároltuk, de nem hosszabb ideig, mint 2 hét. A módszer felállításához több előkezelési és DNS izolálási módszer próbáltunk ki, melyek közül az alábbira esett választásunk egyszerű és gyors kivitelezési volta miatt. Az előkészítéshez a

fagyasztott és transzport médiumban lévő mintákat szobahőmérsékleten felolvasztottuk. Vortexelés után Eppendorf-csövekbe 50 µl mintához 50 µl ultratisztaságú deionizált vizet mértünk, majd ismét jól összekevertük az elegyet. 100°C-on 10 percig inkubáltuk a mintákat, majd 6000 rpm-en 10 percig centrifugáltuk, majd a további vizsgálatokhoz a felülúszót használtuk. A kvalitatív vizsgálat elvégzéséhez a *M. genitalium* törzsoldat 50 µl-ét használtuk, a kvantitatív vizsgálatához a törzsoldat ( $10^8$  CFU/ml) tizes léptékű hígításait használtuk a DNS izoláláshoz, a minták PCR-hez való előkészítéséhez. A *M. genitalium* fő adhezin fragmentjének kimutatásához használt PCR reakcióelegy (premix) 25 µl végtérfogatban 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2µM mindegyik primerből (MgPa-1 és MgPa-3), 200 µM dNTP mix (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA), 1x PCR puffer deionizált vízzel kiegészítve, 2,5U *Taq* DNS polimerázzal (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA) és 25µl előkezelt mintából (templát) kiegészítve készült. A PCR premixet összemértük, a *Taq* DNS polimerázt csövenként külön adtuk hozzá, majd a minták felülúszójából 25µl-t adtunk a csövekben lévő előre elkészített mixhez. Az irodalomban is publikált primerek (41,52,58) 25-mer oligomer szekvenciák voltak, a *M. genitalium* fő adheziós protein (140-kDa) gén (MgPa) 281 bp nagyságú szakaszának 5' és 3' végéhez illeszkedtek és szekvenciájuk megfelelt az MgPa-1 (a szekvencia megfelel a gén kódoló szárának 179-206 bp szakaszának):

5'AGTTGATGAAACCTTAACCCCTTGG 3' és az MgPa-3 (a szekvencia komplementer a gén 435-460 bp szakaszának):

5' CCGTTGAGGGGTTTTCCATTTTGC 3' bázis sorrendnek.

Az amplifikálást Perkin-Elmer Thermalcycler GeneAmp PCR System 9600 automatában végeztük az alábbi 3-hőmérsékletű PCR amplifikációs ciklussal: 95°C 1 perc, 60°C 1 perc, 72°C 1 perc 35 amplifikációs cikluson keresztül, majd a folyamatot 72°C 5 perc terminális extenzióval fejeztük be. A PCR termékek detektálása 1,5%-os agaróz gélben (LKB DNA/RNA Agarose, LKB Produkter AB, Bromma, Svédország) 0,5X TBE pufferben történt hagyományos gélelektroforézissel 80V feszültség és 50mA áramerősség mellett. A géleket még elkészítésük ideje alatt 0,5 µg/ml ethidium-bromiddal festettük és az amplifikációs végtermékeket, vagyis a végső kiértékelést az elektroforézis befejeztével UV transzilluminátor és 100 bp-os DNS létra (Low DNA ladder, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA), mint molekulásúly marker segítségével elemeztük (114,126, 132,133,140).

## IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

A nőgyógyászati gyakorlatban a Vvv, az egyik leggyakrabban előforduló infekciós eredetű probléma, amely következtében több millió nő keresi fel évente a nőgyógyászati rendeléseket világszerte. Ezeknek a kórképeknek a háttérében leggyakrabban *Candida* speciesek, *T. vaginalis* és a vegyes anaerob flóra áll. A BV, a Vvv-ben szenvedő páciensek 15-50 %-ban diagnosztizálható, amely nemcsak a kellemetlen nőgyógyászati panaszokban, de a terheseknél rizikó faktort jelent, terhességi komplikációkhoz is vezethet az idő előtti burokrepedés, koraszülés, chorioamnionitis, szülést követő endometritis létrehozásában játszhat szerepet (32,41).

A mycoplasmák-ureaplasmák által okozott fertőzések, - mint az atípusos folyamatok általában- krónikus gyulladást tartanak fent, számolni kell a szövődmények előfordulásával is. Nőbetegeknél a kismencedei gyulladás, meddőség, az intrauterin fertőződés következtében vetélés, idő előtti burokrepedés, az alacsony születési súly (9, 13,81,82,109) lehet a szövődmény.

Férfiaknál a krónikus urethritis mellett a prostatitis, epididymitis, sterilitás léphet fel (16,92,110,130).

### 1. Aerob és anaerob módon végzett tenyésztések eredményei

#### 1.1. Egészséges, tünet- és panaszmentesektől származó vizsgálati anyagok tenyésztési eredményei

Tünet- és panaszmentes nőktől származó 100 hüvelyváladék komplett bakteriológiai vizsgálatát végeztük el. Azt találtuk, hogy a vizsgált hüvelyváladékokból 25 esetben (25%) tenyészttek ki aerob baktériumok. A laktobacillusok mellett, *E. coli*, *E. faecalis* és *S. agalactiae* törzsek tenyészttek ki. 5 esetben került sor *C. albicans* izolálására, 4-esetben *M. hominis* és 9-esetben *U. urealyticum* tenyésztett ki. (8. táblázat)

Barlett (4) Lindner (74) és Mardh (79) vizsgálataik során a hüvelyflórát alkotó baktériumok kvalitatív és kvantitatív vizsgálata során viszonylag szélsőséges értékeket kaptak. Az általuk vizsgált panasz-, és tünetmentes nők esetében a normál flórát alkotó laktobacillusok mellett aerob baktériumokat 4-72%-os gyakorisággal izoláltak. Gram-

negatív baktériumok közül adatainkkal egyezően az *Enterobacteriaceae* specíesek fordultak elő gyakrabban, a Gram pozitív coccusok 8-72%-os előfordulásúak voltak. A sarjadzó gombák előfordulása saját anyagunkban 5%-os (19,36), míg az említett szerzőknél 4-30%-os gyakoriságú volt.

## 8. táblázat

### Egészséges, tünet és panaszmentes nők tenyésztési eredményei

Szám	Aerob baktérium	Bakteriális vaginózis	Sarjadzó gomba	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i>
100	25*	0	5	4	9

\*= *E. faecalis* 8 , *E. coli* 9 , *S. agalactiae* 8 eset

Egészséges, tünet- és panaszmentes férfiak urogenitális mintáiból végzett tenyésztési vizsgálatok során aerob baktérium tenyésztésére 2 alkalommal került sor, két esetben *M. hominis*, 5 esetben *U. urealyticum* tenyésztett ki. Sarjadzó gomba, vagy anaerob baktérium egyetlen alkalommal sem került izolálásra (9. táblázat). Janier (56) és Szőke (123,124) vizsgálati eredményeit figyelembe véve, valamint a mesterséges megtermékenyítési programban résztvevő egészséges, tünet és panaszmentes férfiak, mint kontroll csoport tagjaitól származó ondómintákból, hasonlóan minimális baktérium ill. sarjadzó gomba izolálására került sor (20,23).

9. táblázat

Egészséges, tünet- és panaszmentes férfiak ejakulátumának  
tenyésztési eredményei

Szám	Aerob baktérium	Anaerob	Sarjadzó gomba	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i>
100	2*	0	0	2	5

\*(*E. faecalis*, *E. coli*)

Az egészséges, tünet és panaszmentesektől származó urogenitális minták értékelésekor fontos a normál flóra kritériumának meghatározása. A kvalitatív értékelés mellett kiemelten fontos szerepe van a kvantitatív meghatározásnak. A nőknél a laktobacillusok jelenléte, ill. hiánya már egy fontos információ a klinikus számára. Az alacsony csíraszámban jelenlévő koaguláz-negatív staphylococcusok, corynebacteriumok, az  $\alpha$ -hemolizáló streptococcusok mellett, néhány (<10 CFU/tampon) sarjadzó gomba, Gram-negatív bélbaktérium tenyészhets ki aerob módon a hüvelyváladékból. Anaerob körülmények között minimális <10<sup>2</sup>CFU/tampon anaerob baktérium tenyészhets ki, a tünet-és panasz mentes nők hüvelyváladékából. Ezen mikroorganizmusok mellett, patogén kórokozó hiányakor „normál flóra tenyésztett” eredmény adható ki. Férfiaknál a mintavétel során a normál flórával érintkezett mintavevőről az alacsony csíraszámban jelenlévő koaguláz-negatív staphylococcusok, corynebacteriumok, az  $\alpha$ -hemolizáló streptococcusok tenyészhetsnek ki. Egészséges, tünet és panaszmentesektől származó vizsgálati anyagok tenyésztése során a mycoplasmák előfordulásával ritkán kell számolnunk (20).

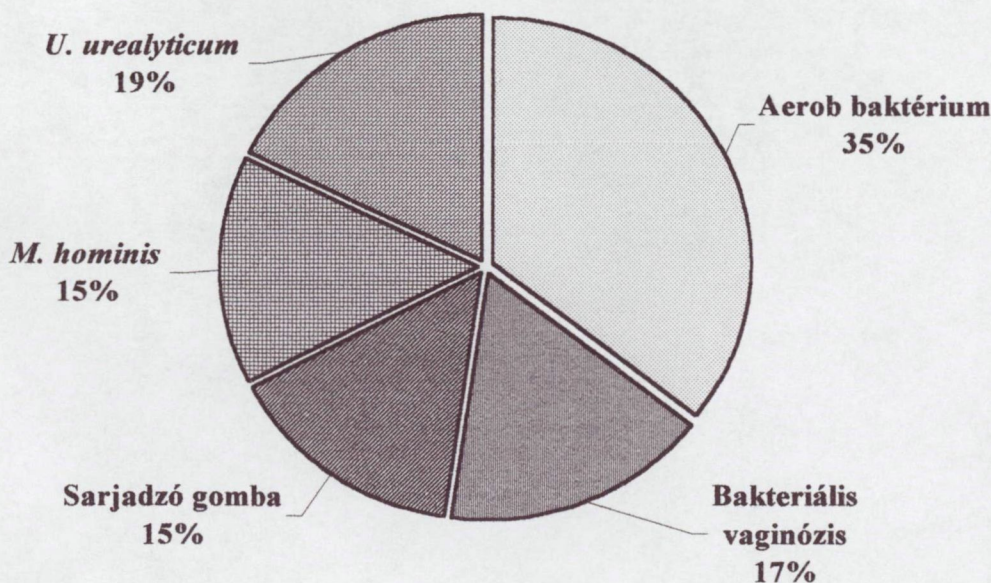


## 1. 2. Urogenitális apparátus gyulladásában szenvedők vizsgálati anyagainak aerob és anaerob tenyésztési eredményei

Az urogenitális apparátus gyulladásos folyamataiban szenvedő betegek vizsgálati anyagainak tenyésztése során 2622 urogenitális mintából, az esetek 33%-ban sikerült patogén mikroorganizmust izolálni (3. ábra). A pozitív eseteket analizálva, az aerob kórokozók előfordulása 35% volt. Hellberg és Hill vizsgálataik során az aerob baktériumok izolálási százaléka 10-60%-os volt. A BV irányú vizsgálataink során 194 esetben (16%) diagnosztizáltunk nagy csíraszámú vegyes anaerob flórát. Az irodalmi adatok szerint a szülészeti, nőgyógyászati klinikákról származó páciensek mintáiból 10-25 % közötti értéket, míg az STD klinikák pácienseinek mintáiból 33-64 %-os előfordulás diagnosztizálható (45,47,62,71,74). Az általunk vizsgált minták nagyobb része származott Szülészeti és Nőgyógyászati ill. Urológiai Klinikáról ( $\approx 70\%$ ), kevesebb az STD ambulanciáról, amely magyarázata lehet az általunk kapott pozitivitási százaléknak (19,25,36).

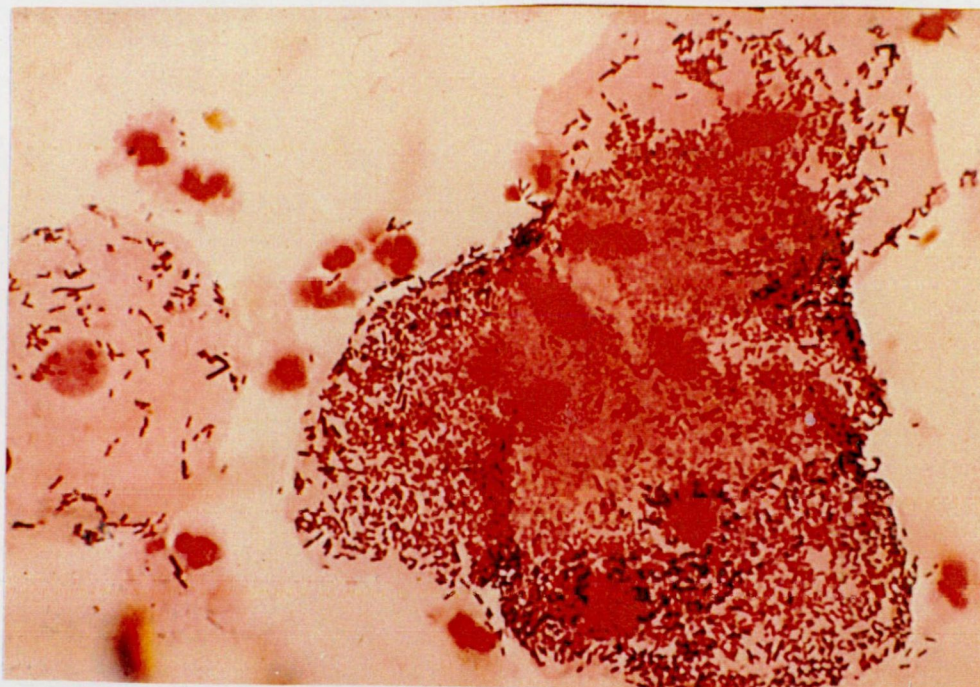
3. ábra

Fluor/kolpitis miatt vizsgált 2622 anyagminta  
tenyésztési eredménye (összes pozitív 874)





Az Amsel-féle diagnózis felállításakor a hüvelyváladék Gram-szerint festett kenetének vizsgálata kritérium a BV meghatározásához. A normál flórát alkotó laktobacillus flórától eltérő, a BV-re jellemző „clue” sejtek mellett, részletesen meghatároztuk a kenetben látható baktériumok alaki jellemzőit is. (4. ábra)



**Bakteriális vaginózis jellegzetes „clue” sejt, Gram festett keneten**

**4. ábra**

A vizsgált 2611 hüvelyváladék kenetének eredménye látható a 10. táblázatban. (25,31)

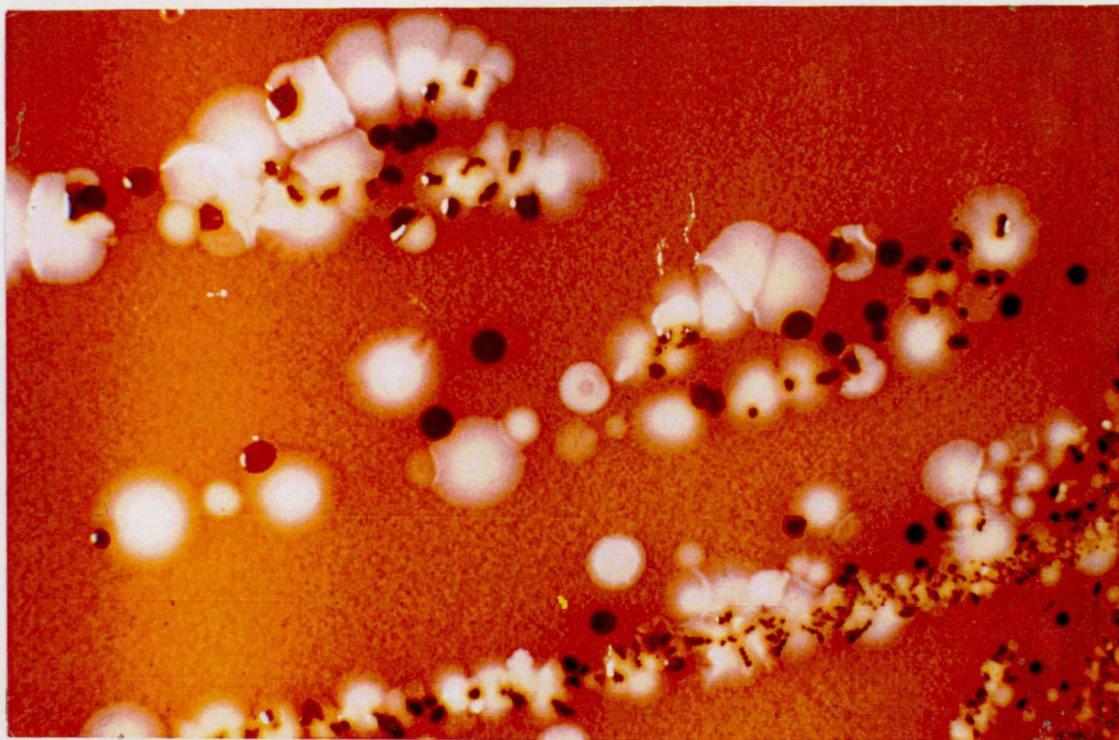
#### **10. táblázat**

##### **2611 hüvelyváladék Gram-szerint festett keneteinek eredménye**

<b>Eredmény</b>	<b>Esetszám</b>
<i>Lactobacillus</i> spp., (más baktérium nem látható)	212
<i>Lactobacillus</i> spp., (normal flóra mellett)	614
Gram-variabilis pálca	601
Hajlékony Gram-variabilis pálca	189
Fusiform baktérium	75
BV (típusos clue sejtek)	265
Gomba elemek	153



Az öt napos anaerob tenyésztést követően a BV diagnózis meghatározása (5. ábra) után az izolátumok species szintű meghatározását is elvégeztük.



**5. ábra**

**Bakteriális vaginózis tenyésztete 5 napos anaerob inkubálást követően**

A vegyes anaerob flórát a legnagyobb gyakorisággal a *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp. és a *Bifidobacterium* spp. alkották a Gram pozitív anaerob baktériumok közül, míg a Gram negatív anaerob baktériumok közül a *Mobilluncus* spp., *Porphyromonas* spp., *B. fragilis*, *Prevotella* spp. fordultak elő. (11. táblázat) A 194 mintából izolált 999 izolátum, mintánkénti 5,15 átlagos baktérium számot jelent (25).

## 11. táblázat

**Anaerob izolátumok megoszlása  
a 194 bakteriális vaginózisból**

<b>Gram pozitív anaerob baktériumok</b>	<b>Esetszám</b>
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	190
<i>Propionibacterium</i> spp.	82
<i>Bifidobacterium</i> spp.	24
<i>Eubacterium</i> spp.	21
<b>Gram negatív anaerob baktériumok</b>	<b>Esetszám</b>
<i>Bacteroides fragilis</i>	108
<i>Bacteroides</i> spp.	24
<i>Fusobacterium</i> spp.	42
<i>Prevotella</i> spp.	158
<i>Porphyromonas</i> spp.	165
<i>Mobilluncus</i> spp.	185
<b>Összes anaerob</b>	<b>999</b>

A bakteriális vaginózisban szenvedő páciensek partnereinek EPS mintáiból végzett komplex tenyésztése során, több esetben a bakteriális vaginózisra jellemző anaerob baktériumok alkotta ún. „vegyes anaerob flórát” sikerült igazolnunk. (123,124,128)

Miután a vegyes anaerob flóra mellett gyakran kíséri az infekciót mycoplasma fertőzés, megvizsgáltuk az egyéb kórokozók BV-vel való együttes előfordulásának gyakoriságát. A 194 BV-t kísérő társfertőző mikroorganizmus összehasonlító analízise azt mutatta, hogy leggyakrabban a *T. vaginalis*-al (24 eset), *E. faecalis* és *Candida* speciesekkel (18-18 eset) fordul elő a vegyes anaerob flóra. Az *U. urealyticum* (10 eset) és a *M. hominis* (6 eset) a BV-vel való együttes előfordulását, az irodalmi adatoktól eltérően ritkább esetben találtuk. (12. táblázat) *Candida* specisesekek közül 174-et (15%) izoláltunk a Vvv kórképet mutató páciensek mintáiból. Levison (71), Eschenbach (32), Elshibly (31) tanulmányaiban 5-25%-os együttes előfordulást tapasztaltak, amelyek megfelelnek az általunk kitenyésztett sarjadzó gomba izolátumok gyakoriságával.

*M. hominis*-ből 175 (15%), és 223 *U. urealyticum* (19%) azonosítására került sor vizsgálati anyagmintáinkból Vvv diagnózis esetén (20,84). Cassel, (13) Elshibly (31) és Mardh (77) munkáikban a *M. hominis* 5-20%, az *U. urealyticum* 10-30%-os gyakoriságról számolnak be, akut ill. krónikus Vvv kórképekben.

12. táblázat

**Bakteriális vaginózis előfordulása  
más vaginális patogénekkal**

Kórokozó	Esetszám
<b>Bakteriális vaginózis</b>	<b>94</b>
+ <i>T. vaginalis</i>	24
+ <i>E. faecalis</i>	18
+ <i>Candida</i> spp.	18
+ <i>S. agalactiae</i>	14
+ <i>M. hominis</i>	6
+ <i>U. urealyticum</i>	10

A Vvv-ben szenvedő nők hüvelyváladékának sarjadzó gomba irányú tenyésztési vizsgálatai során, a *Candida* speciesek pontos identifikálását végeztük el. Az elsődleges azonosítást megkönnyítette a ChromAgar *Candida* táptalajon történő vizsgálat. Az irodalmi adatoknak megfelelően a *C. albicans* volt a leggyakrabban előforduló izolátum (77%). A második leggyakoribb gomba species a *C. krusei* (12%), majd a *C. glabrata* (7%) és a *C. tropicalis* (3%) volt (36). (13. táblázat)

13. táblázat

**174 hüvelyi candidiázisban szenvedő nők  
hüvelyváladékából izolált *Candida* species szerinti megoszlása**

Species	Szám (%)
<i>C. albicans</i>	134 (77)
<i>C. krusei</i>	20 (12)
<i>C. glabrata</i>	12 (7)
<i>C. tropicalis</i>	6 (3)
<i>Candida</i> spp.	2 (1)

### 1.3. Az IUD alkalmazása és a BV között lehetséges összefüggések

Az IUD felhelyezése, tartós alkalmazása rizikótényezőt jelent a Vvv-ek kialakulásához. Az IUD felhelyezését követően általában 4 év ajánlott alkalmazására. Az ajánlott időn túl „fentmaradt” IUD-k esetében az endogén flórából származó aerob baktériumok mellett valamennyi urogenitális infekciót okozó kórokozó előfordulásával számolnunk kell.

#### 1.3.1. IUD minták tenyésztése során nyert eredmények

A tenyésztési vizsgálatok során mindössze 6 minta esetében sikerült, a hüvelyre jellemző normál flórát kitenyészteni a 4 évnél rövidebb ideig alkalmazott IUD esetében. A 22 mintából 26 kórokozó izolálására került sor. A mintánként izolált kórokozók száma 1-2 volt, és az izolált törzsek száma átlagosan 1,2 volt. A leggyakoribb kórokozó az *E. coli*, *E. faecalis* valamint *C. albicans* volt. (14. táblázat)

Összevetve korábbi vizsgálataink során nyert eredményeinket (83), amelyeket azon betegek IUD mintáinak tenyésztése során nyertünk, akiknek bizonytalan alhasi panaszai miatt került sor az IUD eltávolítására átlagosan 1,8 év után, aerob kórokozókat 21%-ban, *M. hominis*-t 9%-ban, *T. vaginalis*-t 7%-ban *G. vaginalis*-t 7%-ban sarjadzó gombákat 3%-ban sikerült vizsgált mintákból kitenyészteni. (Vizsgálataink során ebben az időszakban 5 napos anaerob tenyésztést még nem végeztünk, csak *G. vaginalis* irányú vizsgálatokat.)

Az 5-9 éves IUD minták tenyésztése során egyetlen mintát sem találtunk, amely csak normál baktérium flórát tartalmazott volna. Hetvennégy kórokozó izolálása a 44 IUD-n 1-3 közötti kórokozó számot jelentett mintánként, és 1,7 volt az izolálás átlaga mintánként. Az 5-9 évig alkalmazott IUD-k esetében az aerob kórokozók mellett (*E. coli*, *E. faecalis*, *C. albicans*) gyakran került izolálásra *M. hominis* és *U. urealyticum*.

Azok az IUD minták, amelyeket a páciensek 10 évnél hosszabb ideig viseltek, (legidősebb 16 év) mindössze kettőnél találtunk csak normál flórát alkotó mikroorganizmusokat. Ezen IUD-k mikrobiológiai tenyésztésekor 264 baktériumot izoláltunk a vizsgált 50 mintából. Az izolált baktériumok száma 5 és 8 között volt mintánként és átlagosan 5,02 volt az izolált törzsek száma/IUD.

14. táblázat

IUD minták tenyésztése során nyert eredmények

IUD alkalmazás ideje	Kórokozó nem tenyésztett	Kórokozó/IUD	Izolált min-max./ IUD	Átlagosan izolált törzsek/
< 4 év	6/22	26/22	1-2	1,2
5-9 év	0/44	74/44	1-3	1,7
>10 év	2/50	264/50	5-8	5,02

Eredményeinket csak a BV-ben előforduló kórokozók adataival vethetjük össze, mivel ilyen irányú feldolgozást az irodalomban nem találtunk. A legtöbb esetben tipikus bakteriális vaginózisra jellemző vegyes anaerob flórát találtunk az 5 napos tenyésztés után, amelyeknél a domináló kórokozók a 15. táblázatban láthatóak.

## 15. táblázat

## Az 50 IUD tenyésztése során izolált kórokozók megoszlása

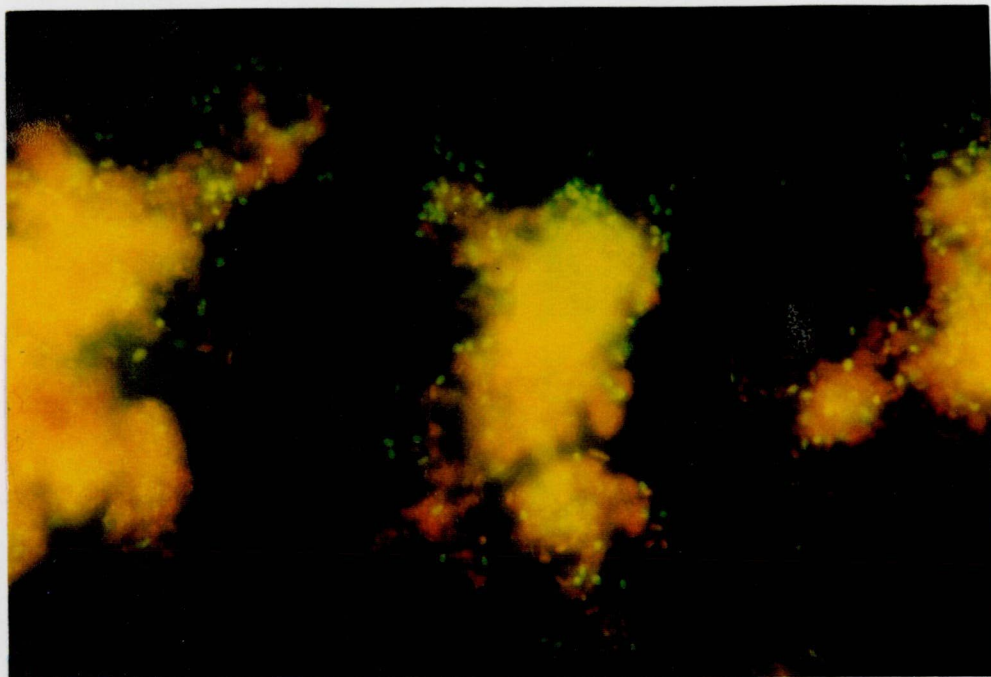
IUD alkalmazás időtartama	Domináló izolátumok	Izolátumok száma
< 4 év	<i>E. coli</i> ,	9
	<i>E. faecalis</i> ,	11
	<i>C. albicans</i>	6
5-9 év	<i>E. coli</i> ,	12
	<i>E. faecalis</i> ,	24
	<i>C. albicans</i> ,	26
	<i>M. hominis</i> ,	7
	<i>U. urealyticum</i>	15
>10év	<i>Mobilluncus</i> spp.	44
	<i>P. melaninogenica</i>	51
	<i>Prevotella</i> spp.	43
	<i>G. vaginalis</i>	26
	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	35
	<i>Actinomyces</i> spp.	41
	<i>M. hominis</i> ,	9
	<i>U. urealyticum</i>	15

## 1.3.2. CLSM vizsgálatok eredményei

Az IUD kis darabkájából (3mm<sup>2</sup>) a mikroszkópos vizsgálatokhoz preparátumokat készítettünk. A Gram-festett keneteket fénymikroszkóppal vizsgáltuk, CLSM vizsgálatokhoz FITC-Concanavalin-A 0,025%, O-safranine 0,25% oldatait alkalmaztuk. A fluorogén festékanyagok különböző hullámhosszúságú excitációja és emissziója lehetővé tette a kombinált festési eljárásnál a baktérium, gomba ill. az általuk termelt biofilm elkülönítését. (6/a-b. ábra)

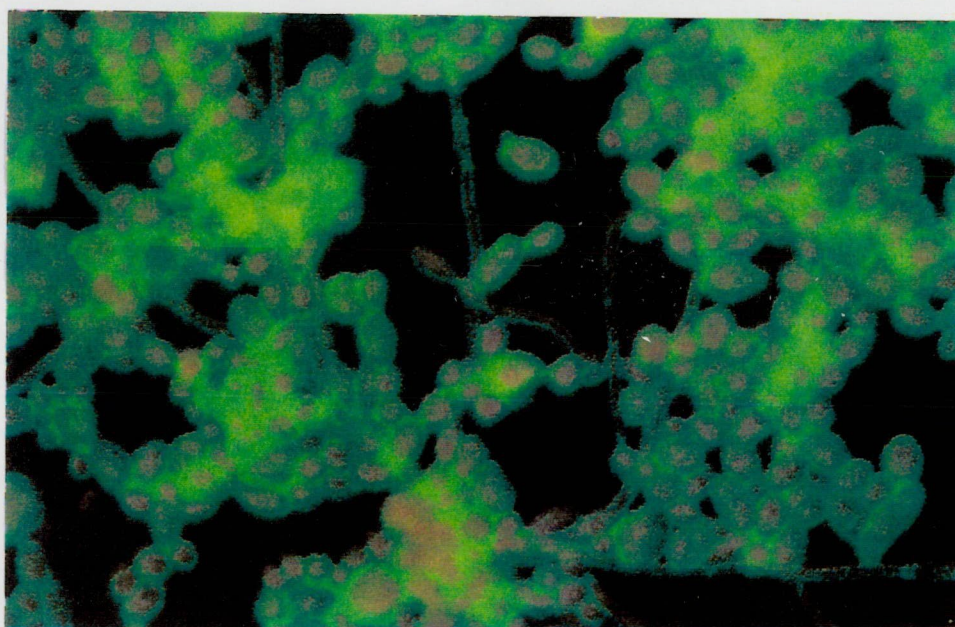
A 10 évnél idősebb minták, amelyeknél a tenyésztés során a BV-re jellemző vegyes flórát találtunk, az azonosított baktériumok nagy része biofilmképzőnek bizonyult. A bizonytalan alhasi panaszok esetén empirikusan alkalmazott antibiotikumok (béta-laktám, béta-laktám+béta-laktamázgátló, fluorokinolon) hatástalanságára ez magyarázat lehet.





**CLSM felvétel IUD eszköz felszínét bevonó biofilmképző vegyes baktériumflóráról**

**6/a. ábra**



**Biofilmképző sarjadzó gomba telepek detektálása IUD felszínén CLSM-el**

**(1000x nagyítás+fototechnikai nagyítás)**

**6/b. ábra**

## 2. Sarjadzó gomba irányú vizsgálatok eredményei

Néhány évvel ezelőtt gombatenyésztést, azonosítást elsősorban a bőrgyógyászati diagnosztikához társuló mikológiai laboratóriumok végezték, főleg dermatophytonok irányában. A legtöbb mikrobiológiai laboratóriumban nem végeztek célzott gomba irányú tenyésztést, az esetleg izolált sarjadzó gombák további azonosítását. A mai klinikai mikrobiológia megköveteli, az elsősorban nem bőrgyógyászati kórképekben előforduló gombák tenyésztési, identifikálási feltételeinek biztosítását. Laboratóriumunkban a sarjadzó és fonalas gombák speciális táptalajon, hosszított inkubációs idejű (7-30 nap) tenyésztését végezzük rutinszerűen.

### 2.1. *Candida* spp. identifikálása során nyert eredmények

Az urogenitális infekciókból izolált 352 *Candida* speciesből: 201 (57%) már a GT próba értékelésekor egyértelműen *C. albicans*-nak bizonyult (16. táblázat). 32 törzs (13,7 %) esetében a negatív GT próba eredménye ellenére a ChromAgar *Candida* lemezen a kékes-zöld színt inkorporáló telepek *C. albicans*-nak bizonyultak. Valamennyi törzs az asszimilációs-fermentációs próbákon, mycellium képzésen alapuló API 20 AUX sztrippel is *C. albicans*-nak voltak identifikálhatóak. A GT negatív törzseket ChromAgar *Candida* lemezen azonosítottuk: a halvány rózsaszínű telepeket képző *C. krusei*-t (n=31), a jellegzetes szürkés-kék színt mutató *C. tropicalis* (n=23) törzseket és a ciklámen *C. glabrata*-t (n=55). A vizsgált törzsek közül további 10 törzs krémszínű-fehér maradt, azaz egyik kromogén szubsztátot sem inkorporálta, így ezek a ChromAgar *Candida*-val nem voltak azonosíthatók. Az API 20 AUX sztrippel, illetve az ATB 32 C kittel ezek a törzsek *C. parapsilosis* (n=7), és *C. lusitaniae* (n=3) speciesbe voltak sorolhatók (24).



16. táblázat

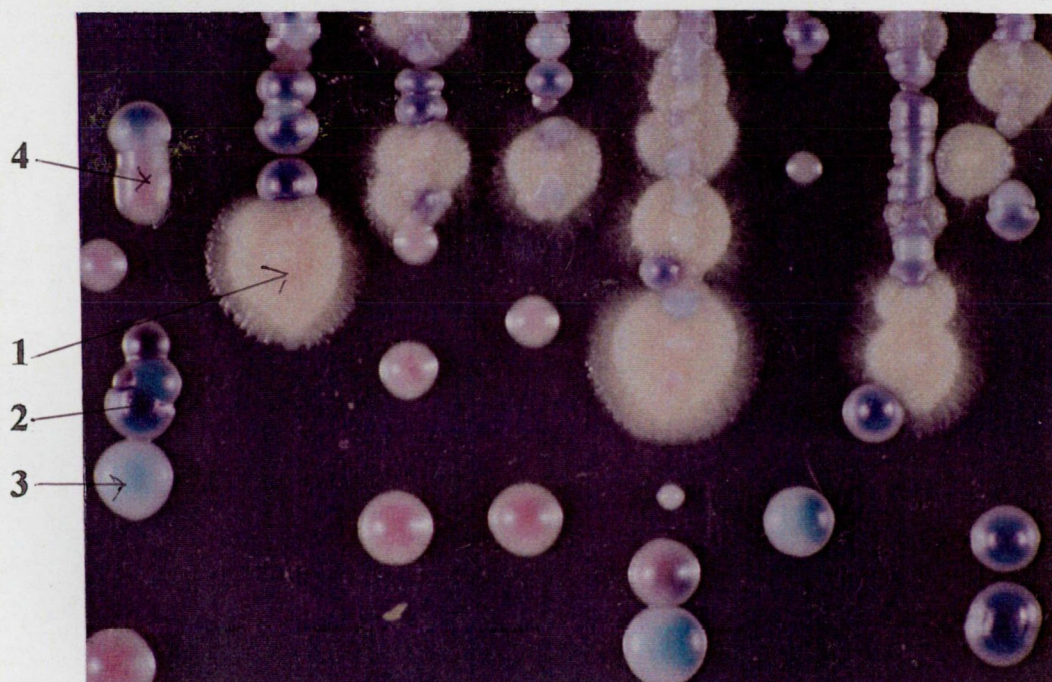
**Candida** speciesek összehasonlító azonosítása  
(352 törzs)

Species	Germ tube		BBL ChromAgar Candida	API 20C AUX
	Pozitív	Negatív		
<i>C. albicans</i>	201	32	233	233
<i>C. krusei</i>	0	31	31	31
<i>C. tropicalis</i>	0	23	23	23
<i>C. glabrata</i>	0	55	55	55
<i>C. parapsilosis</i>	0	7	0	7
<i>C. lusitaniae</i>	0	3	0	3

Vizsgálataink során 3 alkalommal *C. glabrata*+*C. albicans* kevert fertőzés állott fent. A Sabouraud agarról izolált sarjadzó gomba törzsek telepeiből, a ChromAgar Candida táptalajra történő leoltást követően elkülönültek a különböző színű speciesek. A ChromAgar Candida-val és az API 20 AUX sztrippel kapott eredményeket összehasonlítva, a négy leggyakrabban előforduló humán patogén sarjadzó gomba: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* azonosítása 96,7-100%-osnak bizonyult. A *C. parapsilosis* az utóbbi időben szintén komoly problémát jelent különösen a nosocomiális fertőzésekben. A *C. parapsilosis* és az egyéb *Candida* speciesek azonosítására a klasszikus szénhidrát asszimilációs-fermentációs próbákat és a bioMerieux identifikáló rendszereit alkalmazhatjuk. Tapasztalataink alapján mind a szisztémás mikózisokkal, mind a nőgyógyászati gyakorlatban előforduló hüvelyi sarjadzó gomba infekciókból izolált törzsek azonosításában a vegyes gomba infekciók gyors felderítésében a ChromAgar Candida jól használható módszer rutin laboratóriumok számára. Egyaránt jól identifikálhatóak a homogén spéciesek (7/a. ábra), valamint a kevert gombafertőzések a ChromAgar Candida alkalmazásával. (7/b. ábra)



7/a. ábra Homogén *Candida spp.* izolátumok tenyésztete  
ChromAgar Candida táptalajon



7/b. Kevert sarjadzó gomba tenyészetek képe

1. világos rózsaszínű= *C. krusei*, 2. metáلكék= *C. tropicalis*
3. kékes-zöld= *C. albicans*, 4. lilás-rózsaszínű= *C. glabrata*

## 2.2. Sarjadzó gomba törzsek antimycotikum érzékenységének meghatározása

Az antimycotikumokkal szemben meglevő természetes, illetve szerzett rezisztencia ismerete rendkívül fontos az antimycotikus kezelés érdekében. A species szintű azonosítás lehetővé teszi az empirikus antifungális terápia megkezdését.

Bizonyos klinikai kórképek esetében az izolált sarjadzó gombák (hemokultúra, sebváladék, vizeletből izolált) pontos antimycotikum érzékenységének meghatározása elengedhetetlenül fontos. A krónikus Vvv-k, mint rekurrens vagy reinfekció következtében létrejövő candidiózisok esetében célszerű, a terápia rezisztens esetekben a változtatott antifungális szerek alkalmazása helyett, az izolált *Candida* spp-k érzékenységének pontos meghatározása.

### 2.2.1 Sarjadzó gomba törzsek érzékenységének összehasonlító vizsgálatai makro-leveshígításos módszerrel és E teszttel

A referencia törzsek érzékenységét az NCCLS által ajánlott makro-leves hígításos módszerrel és párhuzamosan E teszttel is elvégeztük (87,88).

Az érzékenységi vizsgálatok értékelésének alapjául az NCCLS ajánlása szolgált alapul (17. táblázat)

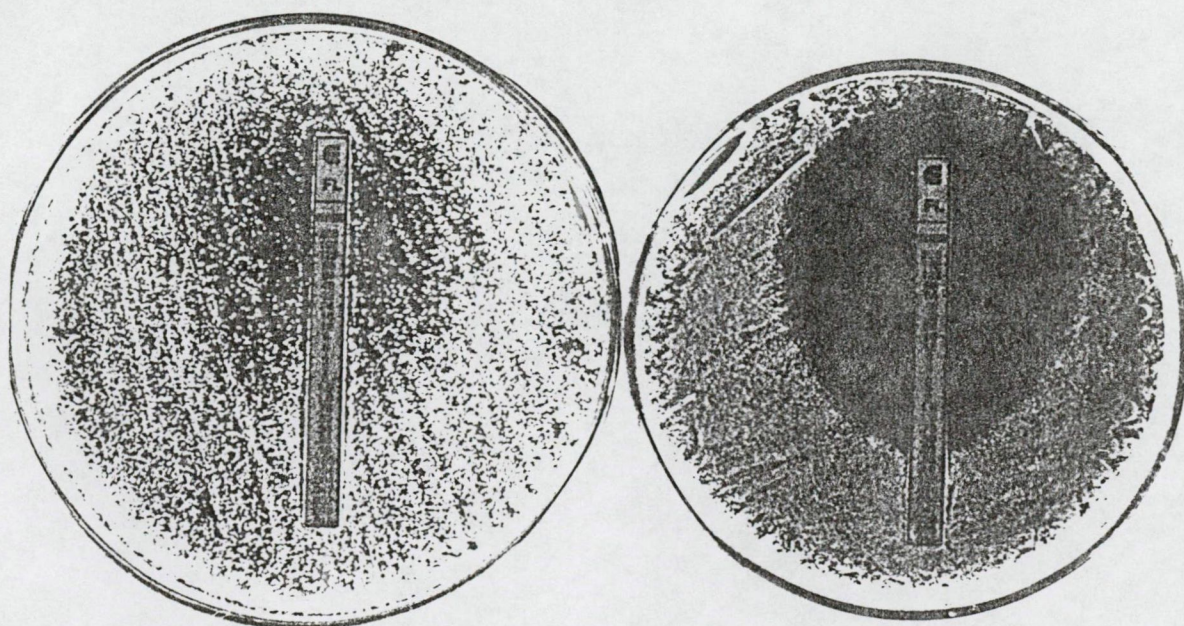
#### 17. táblázat

Interpretatív ajánlás a *Candida* spéciesk in vitro érzékenységének vizsgálatához

Antifungális szer	Érzékeny (É)	Dózisfüggő érzékeny (DFÉ)	Mérsékelten Érzékeny (MÉ)	Rezisztens (R)
Fluconazol	<8	16-32		>64
Itraconazol	<0,125	0,25-0,5		>1
Flucytosin	<4		8-16	>32
Amphotericin B	<2		4	>8



Tíz különböző időpontban, a referencia törzsek érzékenységét párhuzamos összehasonlító vizsgálattal határoztuk meg. A 18. táblázaton látható az érzékenységi vizsgálatok eredménye. A referencia törzsek MIC érték meghatározását a vizsgálati anyagokból izolált sarjadzó gomba törzsek vizsgálatával párhuzamosan mindkét módszerrel elvégeztük. A makro-leves hígítási módszerrel és az E teszttel történő vizsgálatokat, azok értékelését ugyanaz a személy végezte valamennyi vizsgálat során. A legkisebb eltérést, így a legmagasabb egyezési százalékot a két módszer között a *C. albicans* törzseknél észleltük, ahol összehasonlítva 1 hígítási fokban való egyezés 80-90%,  $\pm 2$  hígítási fokban való egyezés 90-100% volt. A legalacsonyabb azonossági százalékot a *C. glabrata* törzseknél kaptuk, amelyek esetében a  $\pm 1$  hígítási fokban való egyezés 70-90%, a  $\pm 2$  hígítási fokban való egyezés 90-100% volt. Az antimycotikumokat vizsgálva a legjobb reprodukálhatóságot sorrendben az amphotericin B, fluconazol és az itraconasollal tapasztaltuk. Az eltérés a makroleves-hígítási és az E teszttel kapott eredmények között egyetlen referencia törzs esetében sem jelentett a vizsgált antimycotikumok esetében érzékenységbeli különbséget. Ha az antimycotikum tulajdonságainak figyelembe vétele nélkül, a rutinban a sarjadzó gombák tenyésztésére alkalmazott Sabouraud agaron végeztük volna el a vizsgálatainkat, mint az a 8. ábrán látható: korrekt MIC érték leolvasásra nem lett volna lehetőségünk.



*C. albicans* törzs érzékenységi vizsgálata E teszttel, Sabouraud és  
RPMI agartáptalajon

## 18. táblázat

**Referencia törzsek antimycotikumok iránti érzékenységének összehasonlító vizsgálata makro levehígítási módszerrel és E teszttel**

Referencia törzs	Antimycotikum	MIC (µg/ml)*		Egyezés %	
		MHM**	E teszt	±1	±2
<i>C. albicans</i> ATCC14053	amphotericin B	0,5-1	0,125-0,5	90	100
	5-flucytosine	2-4	1-2	90	90
	fluconazole	0,25-1	0,125-0,25	90	100
	ketoconazole	0,125-0,5	0,064-0,125	90	90
	itraconazole	0,125-0,5	0,032-0,064	80	90
<i>C. krusei</i> ATCC 749-6258	amphotericin B	0,5-2	0,5-1	90	100
	5-flucytosine	16-32	16-32	70	90
	fluconazole	≥256	≥256	90	100
	ketoconazole	0,5-2	0,5-2	80	90
	itraconazole	0,5-≥1,5	0,5-≥1,5	80	100
<i>C. glabrata</i> ATCC 39316	amphotericin B	0,5-1	0,25-0,5	90	100
	5-flucytosine	0,125-0,5	0,064-0,125	80	90
	fluconazole	≥ 256	128-≥256	90	100
	ketoconazole	0,5-4	0,19-4	70	90
	itraconazole	≥32	8-32	80	100
<i>C. tropicalis</i> ATCC 4563	amphotericin B	0,5-1	0,125-0,5	80	100
	5-flucytosine	0,5-1	0,064-0,25	90	100
	fluconazole	1-2	0,25-1	80	90
	ketoconazole	0,5-1	0,25-1	80	90
	itraconazole	0,5-1	0,125-0,50	80	90

\*MIC(µg/ml)= 10 párhuzamos MIC meghatározás értéktartománya

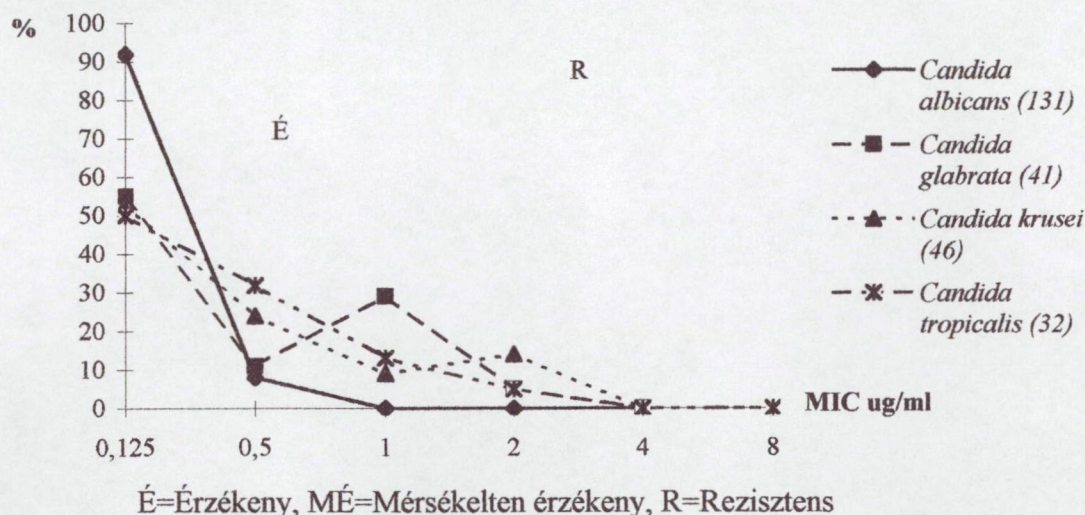
\*\*MHM=mikro hígítási módszer

A 262 klinikai izolátum antimycoticum érzékenységét E teszttel határoztuk meg.

A 9. ábrán látható a négy leggyakoribb humán patogén *Candida* species amphotericin B érzékenysége. A 121 *C. albicans* és a 41 *C. glabrata* izolátum 100%-a, a 32 *C. tropicalis* törzs 95 %-a és a 46 *C. krusei* törzsnek 86%-a volt érzékeny amphotericin B-re.



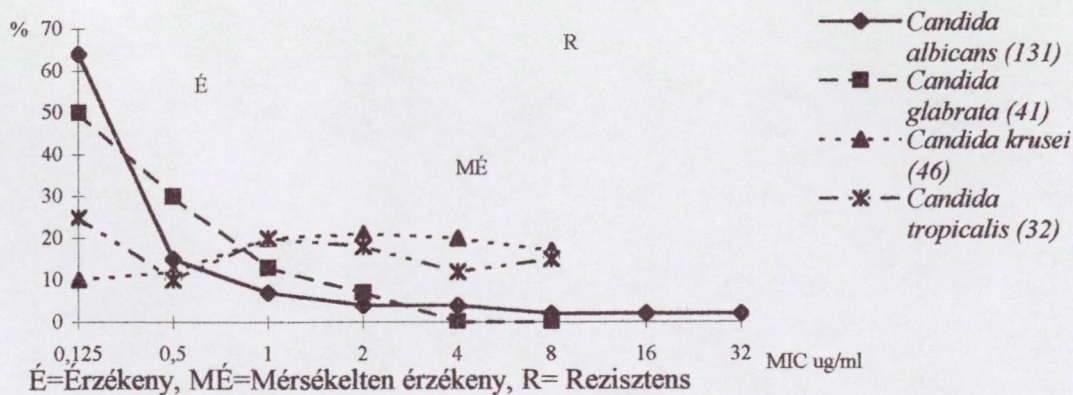




### *Candida* speciesek amphotericin B érzékenysége E tesztel

9. ábra

5-flucytosine-nel szemben (10. ábra) valamennyi *C. glabrata* törzs érzékeny volt, a *C. albicans* izolátumok 94%-os érzékenysége mellett 4% mérsékelt érzékenységet találtunk. A *C. tropicalis* törzsek 85%-ban érzékenyek és 15%-ban mérsékelt érzékenyek bizonyultak. A *C. krusei* izolátumok 83%-a érzékeny, 17%-a mérsékelt érzékeny volt 5-flucytosinra.

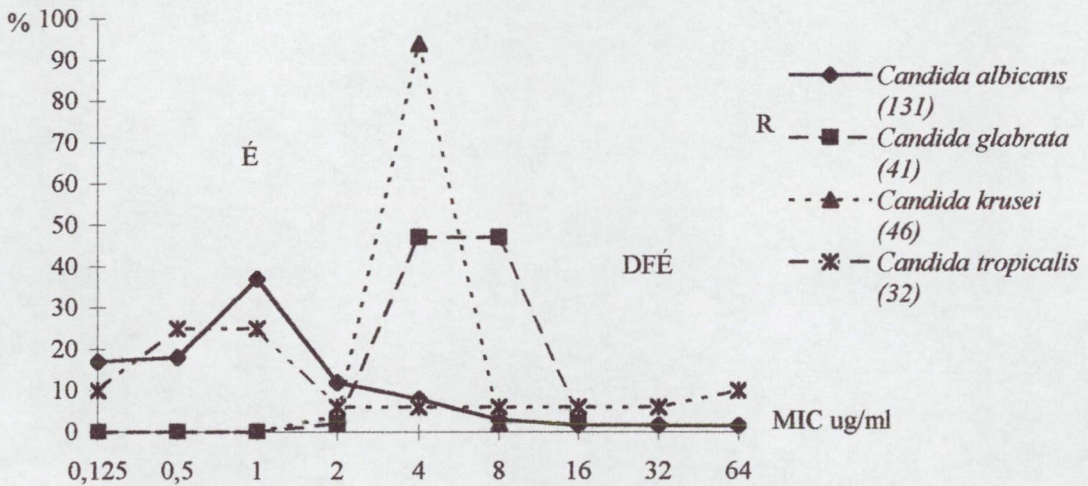


### *Candida* speciesek 5-fluorocytosin érzékenysége E tesztel

10. ábra



A 11. ábrán látható a fluconasollal szembeni rezisztencia megoszlása. Figyelembe véve, hogy a fluconazol esetében in vivo magas terápiás koncentráció érhető el ( $\geq 400\text{mg/nap}$ , ill.  $\geq 6\text{mg/kg/nap}$ ), az NCCLS 1997. évi útmutatása szerint a fluconazol és itraconazol in vitro érzékenységének meghatározásakor dóziszfüggő érzékenységet is meghatároztuk. Így a *C. albicans* törzsek esetében 94%-a érzékenységet és 4%-a dóziszfüggő érzékenységet, a *C. tropicalis* törzsek esetében 78 %-ban érzékenységet, 12 %-ban dóziszfüggő érzékenységet találtunk. *C. glabrata* és a *C. krusei* törzsek a dóziszfüggő érzékenységi tartományban voltak.



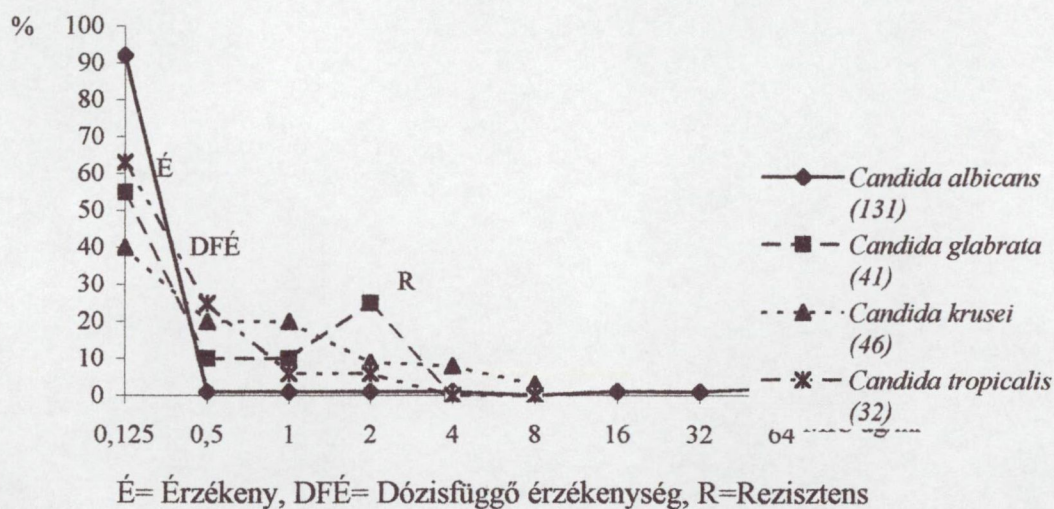
É=Érzékeny, DFÉ= Dóziszfüggő érzékenység, R= Rezisztens

### *Candida* speciesek fluconazol érzékenysége E teszttel

11. ábra

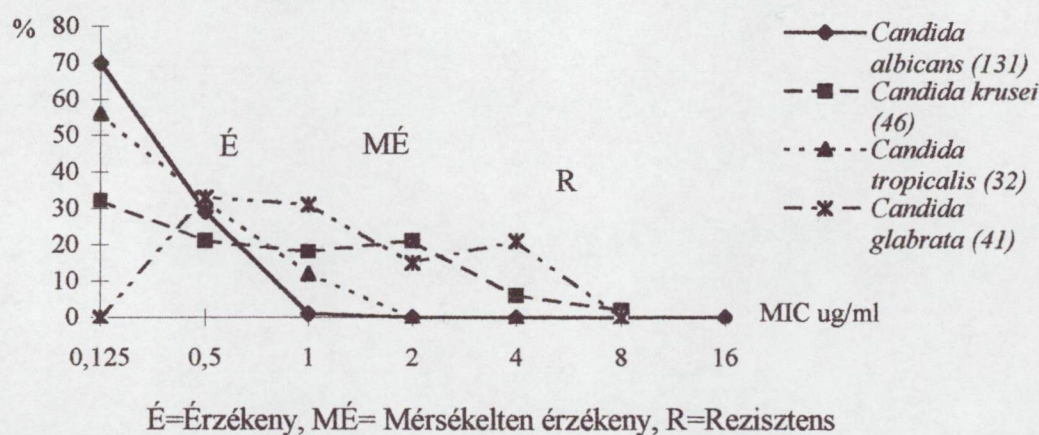
Itraconasollal szemben (12. ábra) a *C. albicans* izolátumok 92%-a érzékenységet és 2%-a dóziszfüggő érzékenységet, a *C. glabrata* törzsek 5%-a érzékenységet, 63%-a dóziszfüggő érzékenységet mutatott. A *C. tropicalis* törzsek esetében 63%-a itraconasolra érzékeny és 31%-a dóziszfüggő érzékeny volt. A *C. krusei* izolátumok 20%-a érzékenynek 40%-a dóziszfüggő érzékenységgűnek bizonyult itraconasollal szemben.





**Candida speciesek itraconazol érzékenysége E tesztel**

12. ábra



**Candida speciesek ketaconazol érzékenysége E tesztel**

13. ábra

Ketaconasollal szemben (13. ábra) a *C. albicans* törzsek 99%-os, a *C. tropicalis* törzsek 88 %-os, a *C. krusei* törzsek 53%-os és a *C. glabrata* törzsek 33%-os érzékenységet mutattak. A sarjadzó gomba törzsek antifungális szerek iránti érzékenységének vizsgálati eredményeit összefoglalva, megállapíthatjuk, hogy a referencia törzsek antifungális



szerek iránti érzékenységét makroleves-hígítási módszerrel és E teszttel vizsgálva a két módszer közötti egyezés  $\pm 2$  hígítási fokban 90%-100%-os volt. Az antifungális szerek kémiai szerkezete alapján kiválasztott speciális táptalajokon, a különböző sarjadzó gomba törzsek igényeinek megfelelő inkubációs idő biztosítása mellett az E teszt alkalmas módszer a rutin mikrobiológiai laboratóriumokban a sarjadzó gombák antimycotikumokkal szembeni érzékenységének meghatározására. Az E teszt előnye a könnyű kivitelezhetőség és megfelelő táptalajok alkalmazása esetén a könnyű és egyértelmű értékelhetőség mellett, hogy szelektáltan a klinikus igénye szerint a kívánt antimycotikum egyedi vizsgálatára is alkalmas módszer rutin körülmények között (26).

**2.2.2. BIOMIC Video System-el végzett érzékenységi vizsgálatok eredményei**

Az vizsgálatok további célja az volt, hogy különböző MIC meghatározó módszerekkel (mikro-leves hígítási módszer, E teszt) hasonlítsuk össze a BIOMIC Video System-mel kapott fluconazol érzékenységi adatokat. A törzsek fluconazol érzékenységének meghatározását 92 *C. albicans* törzs esetén E teszt-tel is elvégeztük. (19. táblázat) A 92 vizsgált *C. albicans* törzs esetében 86 mindhárom módszerrel egyformán érzékenynek bizonyult fluconazol iránt. 6 törzset a Fungitest-tel rezisztensnek, a BIOMIC-kel dózisfüggő érzékenynek találtuk. A rutinban használt Sabouraud, a Casiton és a módosított MH agarlmezekon összehasonlítva az érzékenységi eredményeket látható, hogy pontos MIC érték leolvasására a Sabouraud agar nem megfelelő. (14/a. ábra) A 352 *Candida* species fluconazol érzékenységét BIOMIC Video System-mel határoztuk meg (14/b. ábra).

**19. táblázat**

***C. albicans* törzsek (92) fluconazol érzékenységének meghatározása különböző módszerekkel**

	<b>É</b>	<b>DFÉ</b>	<b>R</b>
Fungitest	86	0	6
E-test	86	4	2
BIOMIC	86	6	0



A BIOMIC-hez csatlakozó statisztikai program elvégzi adott intervallumban, a vizsgált kórokozók species szerinti megoszlásának, érzékenységeinek az értékelését.

A computer program által készített eredeti statisztikai értékelő lap látható a 20. táblázatban.

## 20. táblázat

### MICROBIOLOGY ANTIMICROBIAL CUMULATIVE SUSCEPTIBILITY REPORT

REPORT DATES: JAN 01, 1999 TO DEC 31,1999

Reporting : Percent Susceptible to Fluconazole (%)

	Susceptible (S)	Susceptible dose dependent (S-DD) %	Resistant (R)
<i>C. albicans</i> (233)	98	2	0
<i>C. krusei</i> (31)	48	13	39
<i>C. tropicalis</i> (23)	96	4	0
<i>C. glabrata</i> (55)	69	20	11
<i>C. parapsilosis</i> (7)	86	14	0
<i>C. lusitaniae</i> (3)	100	0	0

Az általunk vizsgált törzsek közül 233 *C. albicans* esetében 98%-os érzékenységet és 2%-os DFÉ-t találtunk. A *C. krusei* törzsek 48%-a volt érzékeny fluconazol iránt, és 13%-a volt DFÉ, 39%-a rezisztens. A *C. tropicalis* törzsek 96%-a volt érzékeny, 4% DFÉ. Az 55 *C. glabrata* species 69%-a mutatott érzékenységet fluconazol iránt, míg 20% DFÉ és 11%-a rezisztens volt. *C. parapsilosis* törzsek–a 86% volt az érzékeny, 14% lett a DFÉ törzsek száma. A *C. lusitaniae* törzsek mindegyike érzékeny volt fluconazolra.

### 3. Mycoplasma irányú vizsgálataink eredményei

A hazai rutin mikrobiológiai laboratóriumok közül mindössze 7-ben végeznek mycoplasma/ureaplasma meghatározást, kereskedelmi forgalomból beszerezhető kit segítségével. Ebből mindössze 4 laboratóriumban éri el az évi vizsgálatok száma az >1000 minta/év számot. A tenyésztéses vizsgálatokat, ill. az azt követő antibiotikum érzékenység meghatározást végző laboratóriumok száma minimálisra tehető. A mycoplasma/ureaplasma fertőzés diagnosztizálását követően így a kezelés 99%-ban empirikusan történik. Az irodalmi adatok a szokásos antimycoplasmás szerekkel szemben számos rezisztenciáról számolnak be. Miután hazai adatok nem állnak rendelkezésünkre, a klinikai mintákból kitenyésztett *M. hominis* és *U. urealyticum* törzsek pontos antibiotikum érzékenységének meghatározását végeztük el (27).

#### 3.1. Referencia törzsek érzékenységének (MIC) összehasonlító vizsgálata

Az antibiotikum érzékenység meghatározást referencia törzsekkel végzett vizsgálatok előzték meg. A 10 alkalommal elvégzett párhuzamos vizsgálat során, a mikro-leves hígítási módszerrel kapott érzékenységi adatokat, E tesztel végzett vizsgálatok eredményével hasonlítottuk össze. A mikro-leves hígítási módszer az NCCLS ajánlásában szerepel, az E teszt a lassan növő, igényes baktériumok (anaerobok, *Campylobacter* spp, stb.) érzékenységének meghatározására alternatíván ajánlott módszer. A *M. hominis* (PG-21) törzs érzékenységi tartománya doxycyclinre mikro-leves hígítási módszerrel a 0,032-0,125 µg/ml, E tesztel 0,016-0,032 µg/ml volt. Ofloxacinra mikro-leves hígítási módszerrel a 0,125-0,25 µg/ml, E tesztel 0,032-0,064 µg/ml, Ciprofloxacin esetében mikro-leves hígítási módszerrel a 0,125-0,25 µg/ml, E tesztel a 0,016-0,032 µg/ml tartományban volt a törzs érzékenysége. Az *U. urealyticum* (T-960) törzs érzékenységi tartománya erythromycinre mikro-leves hígítási módszerrel 0,25-0,5 µg/ml, E tesztel 0,125-0,25 µg/ml volt. Az azithromycin vizsgálatakor az *U. urealyticum* törzs mikro-leves hígítási módszerrel 0,5-1 µg/ml, E tesztel 0,125-0,25 µg/ml tartományban mutatott érzékenységet. Doxycyclinre mikro-leves hígítási módszerrel 0,125-0,25 µg/ml, E tesztel 0,064-0,125 µg/ml, ofloxacinra mikro-leves hígítási módszerrel 0,5-1 µg/ml, E tesztel 0,25-0,5 µg/ml és ciprofloxacinra mikro-leves hígítási

módszerrel a 0,5-1µg/ml, E teszttel a 0,25-05µg/ml érték tartományban volt érzékeny a törzs. (21. táblázat)

Ezen adatok birtokában, amelyek megfelelnek a Kenny, Senterfit és Robertson adatainak (63,103,104,105,106) a két módszerrel kapott MIC értékek között szignifikáns eltérést nem találtunk, a klinikai mintákból izolált *M. hominis* *U. urealyticum* törzsek további antibiotikum érzékenységi vizsgálatait, HIA agar táptalajon E teszttel végeztük.

21. táblázat

Referencia törzsek MIC meghatározása  
mikro-leves hígítási módszerrel és E teszttel

Törzsek	Antibiotikum	MIC(µg/ml)*	
		MHM**	Etest
<i>Mycoplasma hominis</i> (PG 21)	Doxycycline	0,032-0,125	0,016-,032
	Ofloxacin	0,125-0,25	0,032-,064
	Ciprofloxacin	0,125-0,25	0,016-,032
<i>Ureaplasma urealyticum</i> (T-960)	Erythromycin	0,25-0,5	0,125-0,25
	Azithromycin	0,5-1	0,125-0,25
	Doxycycline	0,125-0,25	0,064-0,125
	Ofloxacin	0,5-1	0,25-0,5
	Ciprofloxacin	0,5-1	0,25-0,5

\*MIC(µg/ml)= 10 párhuzamos MIC meghatározás értéktartománya

\*\*MHM=mikroleveshígítási módszer

3.2. Klinikai mintákból izolált *M. hominis* és *U. urealyticum* törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározása

Az 50 *M. hominis* és 50 *U. urealyticum* törzs antibiotikum érzékenységét a referencia törzsek vizsgálatakor alkalmazott antibiotikumokkal végeztük el. (22. táblázat)

Összevetve a két antibiotikum érzékenység meghatározásra alkalmas módszerrel kapott MIC eredményeket, a *M. hominis* törzsek esetében a legnagyobb százalékos egyezést a



$\pm 1$ -es léptékű antibiotikum hígítások esetében az ofloxacinnal 98%-ban,  $\pm 2$ -es hígításnál 100% -ban, ciprofloxacin  $\pm 1$ -es léptékű antibiotikum hígítások esetében 88%-ban,  $\pm 2$ -es hígításnál 100%-osnak kaptuk. A doxycyclin vizsgálatok a  $\pm 1$ -es léptékű hígításoknál 82%-ban,  $\pm 2$ -es hígításnál 98% -ban egyeztek a MIC eredmények a mikro-leves hígítási módszer ill. E teszt esetében. Az *U. urealyticum* törzsek vizsgálatok szintén az ofloxacin esetében találtuk a legnagyobb százalékos egyezést a két módszerrel kapott MIC értékek összehasonlításakor,  $\pm 1$ -es léptékű antibiotikum hígítások esetében az 98%-ban,  $\pm 2$ -es hígításnál 100%-osnak bizonyultak. A ciprofloxacinnál a  $\pm 1$ -es léptékű antibiotikum hígítások esetében az 96%-ban,  $\pm 2$ -es hígításnál 100%-osnak, a doxycyclin esetében a  $\pm 1$ -es léptékű hígítások esetében 70%-os,  $\pm 2$ -es hígításnál 100%-os MIC érték egyezést találtunk. A macrolid antibiotikumok vizsgálatok az erythromycin esetében a  $\pm 1$ -es léptékű egyezést 80%-ban, a  $\pm 2$ -es léptékű egyezést az esetek 94%-ban kaptunk. Az azithromycin vizsgálatok magasabb százalékos egyezést kaptunk mindkét léptékű hígítást vizsgálva: a MIC értékek  $\pm 1$ -es léptékű egyezését 86%-ban, a  $\pm 2$ -es léptékű egyezését az esetek 98%-ban kaptunk.

22. táblázat

A beteg anyagból származó *M. hominis* és *U. urealyticum*  
törzsek antibiotikum érzékenységének összehasonlító vizsgálata

Species	Antibiotikum	MIC( $\mu$ g/ml)				MIC logaritmikus eltérése								% -os	
		MHM*		Eteszt		mikro-leves hígítási módszerrel és E tesztel egyezés									
		Tartomány	MIC <sub>90</sub>	Tartomány	MIC <sub>90</sub>	>-2	-2	-1	0	1	2	>2	±1	±2	
<i>Mycoplasma hominis</i> n=50	Doxycycline	0,032-32	1	0,016-32	0,5	1	8	10	30	1	0	0	82	98	
	Ofloxacin	0,064-32	2	0,032-32	1	0	1	18	29	2	0	0	98	100	
	Ciprofloxacin	0,064-16	0,5	0,032-16	0,5	0	6	7	36	1	0	0	88	100	
<i>Ureaplasma urealyticum</i> n=50	Erythromycin	0,25-8	4	0,032-16	1	0	7	11	28	1	0	0	80	94	
	Azithromycin	0,064-8	1	0,016-4	0,5	0	6	18	25	0	0	0	86	98	
	Doxycycline	0,064-8	0,5	0,016-8	0,25	0	15	9	25	1	0	0	70	100	
	Ofloxacin	0,25-32	4	0,064-	2	0	1	14	32	3	0	0	98	100	
	Ciprofloxacin	0,125-16	4	0,064-4	2	0	2	27	21	0	0	0	96	100	

\*MHM=mikro-leves hígítási módszer

## 4. Molekuláris biológiai módszerek alkalmazása egyes STD kórokozók diagnosztikájában

A hagyományos laboratóriumi módszerekkel elvégzett komplett mikrobiológiai vizsgálat eredménye beleértve a tenyésztést is, 24-120 óra után várható, így mindenképpen a laboratóriumi gyors módszerek beállítása, alkalmazása a cél. A DNS hibridizációs technika, PCR, LCR a rutin mikrobiológiai diagnosztika különböző területein (bakteriológia, mikológia, virológia, parazitológia) már ismertek. Az STD kórokozók diagnosztikája terén a *N. gonorrhoeae* és a *C. trachomatis* volt az első, amelyek diagnosztikájára a fenti módszerek beállításra kerültek és ma már kereskedelmi forgalomban beszerezhetőek.

### 4.1. Génpróbával végzett vizsgálatok

A *G. vaginalis*, *Candida* spp., valamint *T. vaginalis* jelentétének igazolása különböző speciális táptalajokon, 1-5 nap után várható. A klinikus által levett hüvelyváladékból, a mintavételt követő 10+10 percnyi előkészítés és 32 perc 34 mp reakcióidő után a hibridizációs módszerrel eredményt kaphatunk.

#### 4.1.1. Affirm VP III kit bevizsgálása, a teszt érzékenységének megítélésére

BV kontrolljaként egy BV tüneteire utaló asszony hüvelyváladékának vegyes anaerob tenyésztését alkalmaztuk. A hüvelyváladékból az anaerob tenyésztés során *G. vaginalis* és vegyes anaerob flóra (*Mobiluncus* sp., *Prevotella* sp., *Bacteroides* sp., *Porphyromonas* sp., *Peptostreptococcus* sp.) tenyésztett. Az agar lemez felületén a fenti kórokozók  $>10^5$  telepszámban tenyészttek. A minta az Affirm VP III teszttel erős pozitivitást mutatott.

A *Candida* spp. kontrollálására *C. albicans* ATCC 14053 törzs  $10^4$  CFU/ml tenyésztését alkalmaztuk. Az Affirm VP III teszttel a minta erős pozitivitást mutatott.

A  $10^5$ /ml csíraszámú *T. vaginalis* tenyészet 100  $\mu$ l-nyi mennyiségével átitatott tamponos mintája, amely a *T. vaginalis*  $\approx 10^4$  csíraszámát jelenti tamponon, az Affirm VP III teszttel pozitív eredményt adott.



#### 4.1.2. Klinikai minták hibridizációs próbával végzett vizsgálatának eredményei

A válogatott beteganyag lehetővé tette, hogy viszonylag magas pozitívást találtunk vizsgálataink során. A válogatás kritériumai az alábbiak voltak: Először jelentkező beteg esetében a tipikus vaginitisz tünetei mellett a hüvely pH extrém mértékű eltérése a normál hüvely 3,5-4 értékétől, KOH teszt pozitivitás. Visszatérő beteg esetében: a korábbi tenyésztési eredménye ne legyen aerob kórokozó baktérium, vagy az alkalmazott terápia ellenére nem következett be gyógyulás, vagy javulás.

A teszt a bakteriális vaginózis diagnosztikáját, elsősorban a *G. vaginalis* jelenlétére alapozza. A bakteriális vaginózis kórképre -a vegyes anaerob flóra- a jellemző: a *G. vaginalis* mellett *Mobilluncus* sp., *Prevotella* sp., *Bacteroides* sp., *Porphyromonas* sp., *Peptostreptococcus* sp., *M. hominis* törzsek magas csíraszámú együttes jelenléte. Vizsgálataink során 13 esetben az anaerob tenyésztés és az Affirm teszt bakteriális vaginózis pozitív eredményt adott. Két minta az Affirm teszttel gyengén pozitívnak bizonyult *G. vaginalis*-ra. Ebben a két esetben az anaerob tenyésztés során *G. vaginalis* nem tenyésztett, azonban nagy csíraszámú egyéb anaerob kórokozó: *Mobilluncus* sp., *P. melaninogenica*, *B. fragilis*, *P. micros* került identifikálásra. Ezekben az esetekben a gyenge pozitivitás oka a következő lehet: Az Affirm VP III a *M. mulieris*  $4 \times 10^6$ /ml és a *Bifidobacterium dentium*  $8 \times 10^5$ /ml csíraszámú esetén egy nem specifikus *G. vaginalis* pozitív eredményt ad. Az Affirm VP III. *Candida* spp. pozitív eredményeket a Sabouraud-agar lemezen történt tenyésztés mind a 12 esetben igazolta. Gram-szerint festett kenetben 11 esetben voltak sarjadzó gomba elemek láthatók. Az Affirm VP III *Candida* sp. keresztreakció révén pozitív eredményt mutat a *Cryptococcus neoformans*  $1 \times 10^8$ /ml csíraszámú esetén. A *Cryptococcus neoformans* előfordulása vulvovaginitisben elenyésző, vizsgálati anyagmintáinkból nem izoláltuk ezt a kórokozót.

Laboratóriumunkban a *T. vaginalis* diagnosztikája tenyésztéssel történik, CPLM (cystein, protein, liver, maltóz) szemiszolid táptalajban. Vizsgálataink során az Affirm VP III teszttel 2 esetben kaptunk pozitív eredményt, míg tenyésztéssel 5 alkalommal. Ezt az alacsony egyezési arányt magyarázhatja a kontrollként elvégzett, korábban említett vizsgálat eredménye, mely szerint csak a  $\geq 10^4$ /ml csíraszámú tenyészet adott pozitív eredményt az Affirm VP III teszttel. A parazitológiai diagnosztikában már a vizsgálati mintát tartalmazó táptalaj egy cseppjében a mikroszkópos vizsgálat során egyetlen *T. vaginalis* jelenléte is



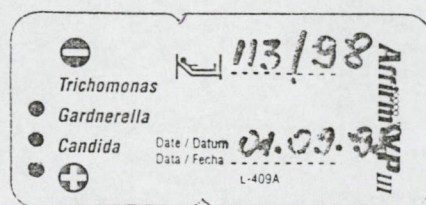
pozitív eredményt jelent, az ilyen alacsony csíraszámú kórokozó kimutatása az Affirm VP III teszttel nem lehetséges.

Három esetben az Affirm teszt és a tenyésztéses vizsgálatok is kevert fertőzést igazoltak (14. ábra). Mindegyik esetben a bakteriális vaginózist *Candida sp.* infekció kísérte (28) (23. táblázat).

### 23. táblázat

**68 hüvelyváladékból Affirm VP III hibridizációval  
tenyésztéssel azonosított kórokozók megoszlása**

Pozitív esetek száma			
	Affirm VP III	Gram-kenet	Tenyésztés
Bakteriális vaginózis	13	13	13
<i>Candida</i> spp.	12	11	12
<i>T.vaginalis</i>	2	-	5
BV+ <i>Candida</i> spp.	3	3	3



**Affirm VP III. PAC lap klinikai mintával**

### 14. ábra

A tenyésztési vizsgálatok során kórokozó baktérium nem tenyésztett ki, csak a normál hüvelyflórát alkotó laktobacillus flóra 35 mintából. 33 mintából 11 esetében a gén próbával

kimutatható kórokozók mellett, aerob baktériumok is kitenyészték. (24. táblázat) A mintákból izolált 44 kórokozó baktérium, mintánként 1,3 baktériumot jelentett.

#### 24. táblázat

**A tenyésztés során izolált, a teszttel ki nem mutatható  
egyéb kórokozók előfordulása 68 hüvelyváladékban**

Species	Esetszám
<i>S. agalactiae</i>	11
<i>S. aureus</i>	1
<i>E. faecalis</i>	14
<i>E. coli</i>	8
<i>Enterobacter sp.</i>	2
<i>Klebsiella sp.</i>	3
<i>M. hominis</i>	3
<i>U. urealyticum</i>	2

A Vvv-ben második leggyakrabban előforduló kórokozók a sarjadzó gombák, amelyek a felnőtt nők 75 %-nál életük során legalább egyszer, 40-50 %-nál legalább kétszer és közel 5 %-nál még gyakrabban (3-5x) visszatérve okozzák a hüvely gyulladását (118). A három kórokozó közül a *Candida sp.* azonosítása a tenyésztéssel összehasonlítva 100%-os érzékenységnak bizonyult, a közismerten gyengébb hatásfokú Gram-szerint festett keneteknél érzékenyebbnek (11/12). A három kórkép közül a *Candida spp.* okozta Vvv kimutatására az Affirm VPIII teszttel kapott eredményeket a tenyésztéssel összehasonlítva, a pozitív és negatív prediktív érték 100%-osnak bizonyult. A Gram-szerint festett keneteknél, érzékenyebbnek találtuk a hibridizációs módszert. A izolált 22 sarjadzó gombából 20 esetében voltak a gomba képletek a kenetben is láthatóak. Ez az eredmény megfelel a sarjadzó gombák oligonucleotid próbával történő kimutatását végző Ferris és mts-i eredményeinek (34). A BV diagnosztikájában két olyan pozitív eredményt kaptunk az Affirm VPIII teszttel, amelyekből a tenyésztéses eljárás során *G. vaginalis* nem tenyésztett ki. A

vegyes anaerob flórában azonban, nagy csíraszámokban izoláltunk *Mobiluncus* spp.-t, amely nem specifikus pozitivitást adhat a hibridizációs tesztben.

Brieselden és Ferris, a klasszikus "Amsel" kritériumok alapján a klinikai tüneteket, illetve a festett kenet és a tenyésztési eredményeket vizsgálták párhuzamosan a nukleinsav hibridizációs próbával. A vizsgált módszerekkel kapott eredményeket összehasonlítva, 95-90%-os egyezést kaptak. Saját vizsgálataink során a bakteriális vaginózis diagnosztikájában 31 minta esetén a Gram-szerint festett kenet és a tenyésztési vizsgálat eredménye alapján, amely megegyezett a gén próbával, BV diagnózist lehetett felállítani (28). Két olyan pozitív eredményt kaptunk az Affirm VPIII teszttel, amelyekből a tenyésztési eljárás során *G. vaginalis* nem tenyésztett ki. A teszt a már tenyésztésre alkalmatlan, elpusztult kórokozók kimutatására is alkalmas, de a vegyes anaerob flórából nagy csíraszámokban izolált *Mobiluncus* spp. is adhatott nem specifikus pozitivitást a DNS hibridizációs tesztben. Az összehasonlító vizsgálat 93,7%-os pozitív és 91,2 %-os negatív prediktív értéket adott.

A *Trichomonas vaginalis* a harmadik, de nem elhanyagolható szerepet játszó szexuálisan átvihető kórokozó a Vvv-ban, amely a világon évente 180 millió ember fertőzését okozza. A *T. vaginalis* kimutatása során, míg tenyésztéssel 5 esetben igazolódott a kórokozó jelenléte a DNS hibridizációs technikával mindössze 2 esetben kaptunk pozitív eredményt. A *T. vaginalis* kimutatása során, míg a CPLM táptalajban tenyésztéssel 12 esetben igazolódott a kórokozó jelenléte, a DNS hibridizációs technikával 10 esetben kaptunk pozitív eredményt. A pozitív prediktív érték 83,3%-os a negatív 96,2%-os értékűnek bizonyult. Ez az egyezési százalék alacsonyabb, mint DeMeo és Ferris eredményei (18, 34), azonban közel egyező Brieselden (7) által kapott vizsgálati eredményekkel. DeMeo és Brieselden Diamonds táptalajt alkalmazott a *T. vaginalis* tenyésztésére. DeMeo és mts-i 98,3%-os, Brieselden és mts-i 80%-os egyezést kaptak a vizsgált módszerekkel. Ferris 90%-os egyezést kapott a klinikai kép, a kenet és KOH vizsgálattal kapott eredményeket összehasonlítva a génpróba eredményeivel. A Vvv leggyakoribb kórokozóinak, egyetlen tesztben történő kimutatására korábban nem volt lehetőség. A klasszikus tenyésztési eljárásokkal összevetve, az Affirm VPIII DNS hibridizációs teszt rendkívül gyorsan, megfelelő érzékenységgel ad eredményt a Vvv diagnosztizálásában.

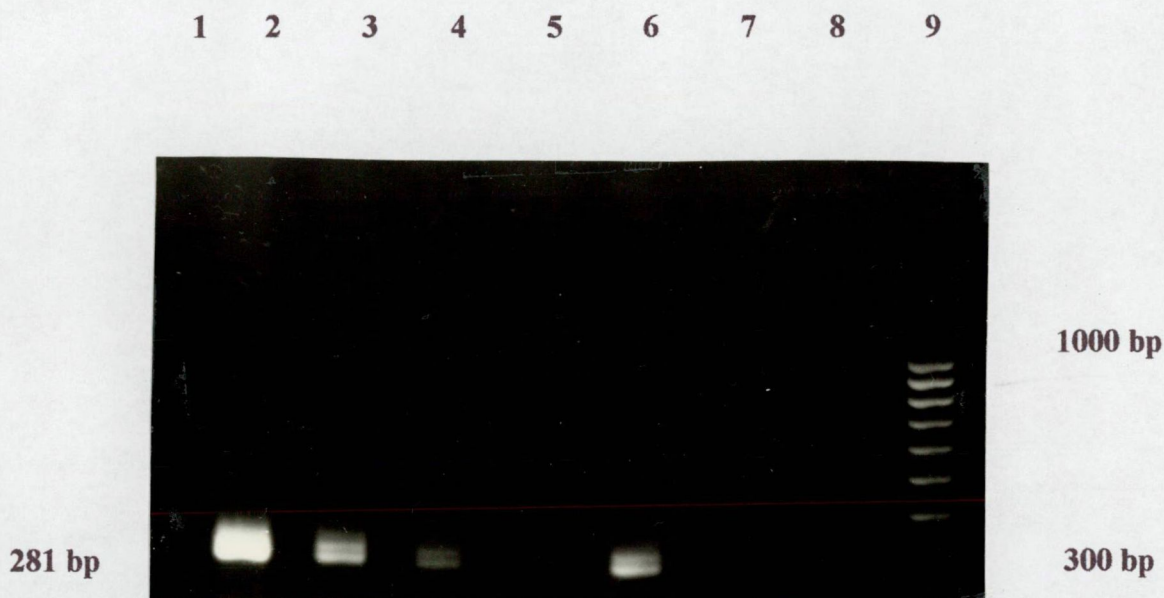
#### 4.2. PCR –rel végzett vizsgálatok eredményei *M. genitalium* kimutatására

A *M. genitalium* bizonyítottan az urogenitális szervek humán patogén kórokozója (126,129,130,131). A *M. genitalium* a mycoplasmák között is különösen nehezen tenyésztethető kórokozó, amelynek kimutatása szinte csak korszerű mikrobiológiai módszerekkel lehetséges (50,58). Napjainkban a nukleinsav amplifikáción alapuló módszerek, mint pl. a PCR, alkalmazásának elérhetőségi feltételei egyre közelebb kerülnek a klinikai laboratóriumok mindennapjai számára is (97). A *M. genitalium* DNS klinikai mintákban való jelenlétének detektálására laboratóriumunkban bevezettük a polimeráz láncreakcióval történő kimutatását (136). Targetként az irodalomból ismert *M. genitalium* 140-kDa adhéziós proteinjének génjét választottuk, mely vélhetően esszenciális patogenitási szereppel bír a baktérium megbetegítő képessége során. Az előzetes kísérletek során az MgPa-1 és MgPa-3 primerekkel amplifikált előkezelt *M. genitalium* törzsből sikerült kimutatni a várt 281 bp nagyságú fragmentumot, mely az ethidium-bromiddal kezelt gélen egyetlen csík formájában jelentkezett (14. ábra 2. oszlopa). A negatív kontrollként használt deionizált víz egyetlen esetben sem adott pozitív reakciót, az adhezin gén specifikus szakaszt nem detektáltuk (14. ábra 1. és 8. oszlopa). Irodalmi adatok is bizonyítják, hogy a választott módszer egyéb kórokozókkal keresztreakciót nem ad (52), ellentétben a különböző szerológiai módszerekkel (Lind 72,73).

Kísérletsorozatunkban bizonyossá vált, hogy a PCR alkalmas a *M. genitalium* genom néhány száz kópiáját (esetünkben a  $10^{-3}$  hígításában is) detektálni. A Dániából érkezett *M. genitalium* referencia törzs hígítási sorozatával, titrálásával laboratóriumunkban a target kimutathatóságának alsó határát határoztuk meg. A negatív kontrollként használt deionizált víz és egyéb mikrobiológiai vizsgálatokkal mind negatív, mind pozitív vizsgálati anyagok esetén hamis-pozitív eredmény nem fordult elő. Tehát a vizsgálati anyagokban lévő, egyéb mikroba jellegű DNS, mely főleg bakteriális eredetű volt, illetve humán DNS nem szolgált templátként az amplifikáció során és így nem detektáltuk a 281 bp nagyságú specifikus szekvenciát. Az amplifikációt gátló anyagok jelenlétének vizsgálata nagy jelentőséggel bír egyéb PCR-t alkalmazó vizsgálati módszerek esetében is főleg ott, ahol tamponos vizsgálati anyagokat Mahoni, Tøye, Wiedbrauck (75, 127, 140) használnak (pl. hüvelyváladék, húgycsőváladék, esetenként a vizelet is).



A *M. genitalium* törzs tízes léptékű hígítási sorozata során detektáltuk az agaróz gélen az ethidium-bromiddal megfestett csíkok intenzitásának csökkenését, ami jelzi a specifikus templát DNS mennyiségének csökkenését. A legerősebb intenzitást mutató csík a tömény törzsoldatból izolált DNS (15. ábra 2. oszlop) esetében figyelhető meg, míg az 1000x-os hígítás esetén is még detektálni tudtuk, nagyon halványan, a baktérium jelenlétét igazoló amplikont (15. ábra 5. oszlop).



**15. ábra. A *Mycoplasma genitalium* törzs hígítási sorozatából és negatív klinikai mintába inokulált extrahált DNS gélelektroforézis képe az amplifikálást követően.**

1. oszlop: deionizált víz (negatív kontroll), 2. oszlop: tömény *M. genitalium* törzs (pozitív kontroll), 3. oszlop: a törzs 10x hígítása, 4. oszlop: a törzs 100x hígítása, 5. oszlop: a törzs 1000x hígítása, 6. oszlop: klinikai minta "megtüzelése" *M. genitalium* törzsből izolált DNS- sel, 7. oszlop: a 6. oszlopban használt vizsgálati anyag templát nélkül, 8. oszlop: deionizált víz (negatív kontroll), 9. oszlop: 100 bp DNS létra (molekulasúly marker).

A PCR és egyéb mikrobiológiai vizsgálatokkal negatív urogenitális mintához kevert *M. genitalium* törzsből extrahált DNS amplifikációja során nem találtunk inhibitor jelenlétére utaló jelet, vagyis a gélen látható volt a specifikus szekvencia (15. ábra 6. oszlop), míg ugyanezen *M. genitalium* DNS nélküli minta (15. ábra 7. oszlop) negatív volt az amplifikálást követően. A kapott vizsgálati eredményeket egy 100 bp-os DNS létra (15. ábra 9. oszlop) band-jeihez viszonyítottuk. A betegmintákat tartalmazó transzport médiumba, a valódi kísérleti feltételeknek megfelelő körülményeket utánozva,

inokuláltuk a *M. genitalium* referencia törzsből kinyert DNS-t és végeztük el az amplifikációs eljárást, mellyel modellkísérletünk hatékonyságát és kivitelezhetőségének gyorsaságát vizsgáltuk.

Vizsgálataink során összesen 81, infertilitás miatt vizsgált beteg urogenitális mintájának vizsgálatára nyílt lehetőségünk. A *C. trachomatis* vizsgálatra (COBAS AMPLICOR teszt Roche, Indianapolis, USA) érkezett minták között 19 hüvelyváladék és 62 húgycsőváladék szerepelt, mely utóbbi kizárólag férfiakról származott (25. táblázat).

A hagyományos mikrobiológiai tenyésztés során a megvizsgált klinikai mintákban aerob módon 10 anyagból *E. faecalis*, 1 esetben *S. aureus*, 6 esetben *E. coli*, 7 esetben *C. albicans*, 9 esetben *S. agalactiae*, 3 esetben 2 aerob kórokozó tenyésztett. Anaerob körülmények között 13 húgycsőváladékból vegyes anaerob flóra tenyésztett, 9 mintában *U. urealyticum* és 8 mintában *C. trachomatis* volt kimutatható. Míg 15 urogenitális váladék (8 hüvelyváladék, 7 húgycsőváladék) az egyéb mikrobiológiai vizsgálatokkal kimutatható kórokozót nem tartalmazott.

## 25. táblázat

**Urogenitális pathogének kimutatása a PCR-el párhuzamosan  
végzett tenyésztési módszerekkel.**

Kórokozó	Vizsgálati anyag		
	hüvelyváladék	húgycsőváladék	összesen
<i>S. aureus</i>	0	1	1
<i>E. faecalis</i>	2	8	10
<i>E. coli</i>	3	3	6
<i>C. albicans</i>	2	5	7
<i>S. agalactiae</i>	2	7	9
Vegyes aerob flóra	0	3	3
Bakteriális vaginózis	0	13	13
<i>M. hominis</i>	0	0	0
<i>U. urealyticum</i>	2	7	9
<i>C. trachomatis</i> (PCR)	0	8	8
<i>M. genitalium</i> (PCR)	0	0	0

A klinikai minták amplifikálása során *M. genitalium* jelenlétére utaló, pozitív mintát nem találtunk. A relatív alacsony mintaszám miatt a fő szelekciós kritérium az inhibitorok jelenlétének kizárása volt. Emellett a BV, *T. vaginalis* és *Candida* fertőzések együttes előfordulása valószínűsítheti a *M. genitalium* infekció esetleges jelenlétét. Irodalmi adatok szerint a *M. genitalium* szignifikánsan gyakrabban fordul elő nem *N. gonorrhoeae* okozta urethritis tüneteivel rendelkező (19-27%-ban), mint nem rendelkező, aszimptomatikus (7-9%) férfiaknál Gambini, Hooton, Janier, Taylor-Robinson eredményeiben. Ez a kórokozónak, az NGU-ban játszott szerepét sugallja Jensen (57). Mindemellett jelentős szereppel bírnak az 1984-ben Henle-Koch posztulátumként (Evans 33) ismertetett aszimptomatikus *M. genitalium* hordozók, akik a kórokozó transzmissziójában, a fertőzési lánc fenntartásában játszanak közre. Jól ismert tény az is, hogy a *M. genitalium* nagyobb frekvenciával mutatható ki *C. trachomatis* negatív NGU-s betegek mintáiból, mint társult infekció esetében. A *M. genitalium* főleg a férfi húgycsőben telepszik meg és okozza annak gyulladásos megbetegedését. Ezt támasztja alá Hooton (50) vizsgálatának eredménye, amely összefüggést vél felfedezni a szexuális szokások és az infekció meglétének gyakorisága között, miszerint a homoszexuális férfiak magasabb incidenciával rendelkeznek, mint a heteroszexuális csoport tagjai. A kórokozó izolálhatóságát jelentősen befolyásolni látszik az urethritis tünetek meglétének időtartama. Gambini és munkacsoportja (39) szignifikáns különbséget talált a 15 napnál rövidebb anamnézissel rendelkező és a több mint 2 hete panaszokkal küszködő csoport vizsgálati eredményei között. Az általunk demonstrált, könnyen kivitelezhető vizsgálati módszer újabb és reálisan elérhető távlatokat nyithat az STD megbetegedések diagnosztizálására hazánk több rutin laboratóriuma számára is. Mivel az általunk vizsgált minták nem kifejezetten urethritisben szenvedő pácsensektől származtak, magyarázata lehet annak, hogy nem sikerült pozitív mintát detektálnunk. Az irodalmi adatoktól eltérően hazánkban a *C. trachomatis*, *M. hominis* és *U. ureaplasma* előfordulása is jelentősen alacsonyabb mind a beteg, mind a panasz és tünetmentes populációban (19,20,84). Valószínűsíthetően ez lehet az oka annak, hogy az infertilitásban szenvedő betegcsoport vizsgálata során a modellkísérlet sikeres eredményei ellenére nem sikerült pozitív eredményt kapnunk. Szűkebb, klinikai tünetek alapján jobban szelektált betegcsoportban folytatva vizsgálatainkat, nagyvalószínűséggel felmérhető lesz a *M. genitalium* hazai előfordulása.



A szexuálisan átvihető kórokozók vizsgálata nem ér véget a kórokozók kimutatásával. A pontos diagnosztizálás után a mikrobiológusok, vizsgálva a természetes (mutációs, kromoszómális és plazmidos rezisztencia) és szerzett rezisztenciát a keresztrezisztenciát, a toleranciát, a baktériumok és gombák érzékenységét, összegzik a kapott eredményeket és terápiás javaslatot tesznek. A terápia célja az, hogy a hüvely normál ökológiája helyreálljon, és a kórokozót elimináljuk. A kórokozók visszaszorításában hatékony szerepe van a folyamatosan piacra kerülő antibakteriális és antifungális készítményeknek, de nem elhanyagolható az egészségnevelés, egészségvédelem (primer prevenció), a betegség felderítése, a partnerek felkutatása, tanácsadása (secunder prevenció), a megfelelő kezelés gyors megkezdése, klinikai, intézményi rendszer kialakítása, a képzés és kutatás megszervezése. Ha a nőgyógyász és a mikrobiológus megfelelő szakmai kapcsolatot alakít ki és kihasználja a jelenlegi mikrobiológiai módszertani lehetőségeket, abból a páciensek többszörös előnyt nyernek, valóban a betegség okát szüntetik meg, és ha ez a lehető legrövidebb idő alatt történik, a kezelés a legkisebb költségbe kerül.

## Összefoglalás

A tradicionális nemi betegségek mellett az elmúlt években, számos új kórokozóról is bizonyították, hogy leggyakrabban szexuális úton terjedhetnek. A „Sexually Transmitted Diseases” (STD), mely már a hazai köztudatban is elterjedt, kifejezi e betegségek fertőző voltát, másrészt a terjedés módját is. Az ún. egyéb STD kórokozók a diagnosztikus eljárások fejlődésével egyre inkább az érdeklődés előterébe kerültek. Az STD megbetegedések az egyéb eredetű megbetegedések között jelentős szerepet játszanak, annak ellenére, hogy a szexuális úton közvetített fertőzések beleértve, a klasszikus nemi betegségeket is, az esetek döntő többségében nem véletlen infekciók. A szexuális élettel kapcsolatos felfogás megváltozása, a promiszkuitás, a prostitúció, drog és alkohol hatása, az egyre fiatalabb korban elkezdett szexuális élet magukban hordozzák a fertőzés akvirálásának lehetőségét. A klinikailag tünetmentes betegek mellett egyre nyilvánvalóbb, hogy a tünetmentes hordozók, ill. a késői komplikációkkal jelentkezők az infekciók továbbvitelében hangsúlyozott szerepet játszanak. Az STD megbetegedések jelentősége a meddőség, koraszülések, abortuszok és nőgyógyászati tumorok szempontjából ma már nem kérdőjelezhető meg. Helytelen, vagy késői diagnózis esetén, az infekció nyomán kialakuló gyulladás egyik következménye lehet, az érintett szervek működésének megváltozása, szexuálisan átvihető megbetegedések esetében a reprodukciós képesség csökkenése. A diagnosztikus eljárások fejlődésének köszönhetően, az utóbbi évtizedekben az STD fertőzések új generációjával kellett megismerkednünk, melyek a klasszikusnak számító nemi betegségekkel ellentétben, gyakran tünetmentes fertőzés formájában zajlanak, megnehezítve a korai diagnózis felállítását. A hüvelyflóra megítélése éveken keresztül a hüvelyváladék Gram szerint festett kenete alapján történt. A hüvely normál flórájának mai meghatározása hosszú diagnosztikai folyamat eredménye. A mikrobiológiai tenyésztési eljárások fejlődése következtében ezt egyrészt a különböző *Lactobacillus* specíesek dominanciája, másrészt számos fakultatív és obligát anaerob baktérium kisebb-nagyobb csíraszámában való jelenléte jellemzi. Az urogenitális szervek néhány kiemelten fontos kórokozója szexuális úton is terjedhet. A klinikai mikrobiológiai diagnosztika fejlődése során e kórokozók kimutatására is új módszerek kerültek bevezetésre. A modern mikrobiológiai eljárások bevezetése nem nélkülözheti a módszerek hagyományos tenyésztési eljárásokkal történő összehasonlítását, azok alkalmazhatóságát az STD megbetegedések diagnosztikájában.

ad.1. A vulvovaginális vaginitiszek leggyakoribb kórokozóinak korrekt kimutatása a rutin mikrobiológiai laboratóriumokban nem terjedt el széles körben. Vizsgálataink során hüvelyváladékok komplett tenyésztéses vizsgálatát végeztük el aerob, anaerob, gomba, mycoplasma, ureaplasma, trichomonosis irányában. A hüvelyváladékok Gram-szerint festett kenetének vizsgálati eredményét összehasonlítottuk a tenyésztési vizsgálatok eredményeivel (25,31). Az urogenitális apparatus gyulladásos folyamataiban szenvedő betegek vizsgálati anyagainak tenyésztése során 2622 urogenitális mintából, az esetek 33%-ban sikerült patogén mikroorganizmust izolálni. A pozitív eseteket analizálva, az aerob kórokozók előfordulása 35% volt. A BV irányú vizsgálataink során 194 esetben (16%) diagnosztizáltunk nagy csíraszámú vegyes anaerob flórát. Nőknél az urogenitális szervek gyulladásos folyamataiban kockázati tényezőt jelent az intrauterin eszköz (IUD) alkalmazása. Az STD kórokozók egyik patogenitási faktorának a biofilmképző képességük vizsgálatát, egy kettős fluoreszcens festési eljárással, és annak detektálását confocalis laser scanning mikroszkóppal végeztük. Többnyire a BV-bem előforduló anaerob baktériumok és sarjadzó gombák kerültek izolálásra, amelyek nagy része további vizsgálataink során biofilmképzőknek bizonyult. A Vvv-ban szenvedő páciensek hüvelyváladékából izolált kórokozók előfordulása szignifikánsan magasabb volt, mint egészséges, panasz és tünetmentes nők hüvelyváladékából végzett tenyésztése során (19,20,21,25,36).

ad 2. Az urogenitális mintákból izolált sarjadzó gomba törzsek species szintű azonosításának terápiás jelentősége van. A *C. albicans* mellett az utóbbi időben a rezisztencia problémát okozó sarjadzó gombák előfordulása gyakoribbá vált, így szükséges lett e speciestek gyors, könnyen és pontosan reprodukálható azonosítási módszereinek is a bevezetése a rutin diagnosztikába. A ChromAgar Candida-val és az API 20 AUX sztrippel kapott eredményeket összehasonlítva, a négy leggyakrabban előforduló humán patogén sarjadzó gomba: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* azonosítása 96,7-100%-osnak bizonyult. Tapasztalataink alapján mind a szisztémás mikózisokkal, mind a nőgyógyászati gyakorlatban előforduló hüvelyi sarjadzó gomba infekciókból izolált törzsek azonosításában a vegyes gomba infekciók gyors felderítésében a ChromAgar Candida jól használható módszer rutin laboratóriumok számára. A bakteriológiában hagyománnyá vált Kirby-Bauer korongdiffúziós próbával a sarjadzó gombák antifungális szerek iránti érzékenysége nem megbízható, így a minimális gátló koncentráció meghatározására (MIC) mikro-leves hígítási módszert és E teszt alkalmazását választottuk. A legkisebb eltérést, így a két módszer között a legmagasabb egyezési százalékot a *C. albicans* törzseknél észleltük a  $\pm 2$  hígítási fokban való egyezés 90-100%

volt. Az antimycotikumokat vizsgálva a legjobb reprodukálhatóságot sorrendben az amphotericin B, fluconazol és az itraconazollal tapasztaltuk. Az eltérés a makroleves-hígításos és az E teszttel kapott eredmények között egyetlen referencia törzs esetében sem jelentett a vizsgált antimycotikumok esetében érzékenységbeli különbséget. Az urogenitális szervekből izolált sarjadzó gombák antifungális szerek iránti érzékenységét E teszttel határoztuk meg. A *C. albicans* és a *C. glabrata* izolátumok 100%-a, a *C. tropicalis* törzsek 95 %-a és a *C. krusei* törzsek 86%-a volt érzékeny amphotericin B-re. 5-flucytosine-nel szemben valamennyi *C. glabrata* törzs érzékeny volt, a *C. albicans* izolátumok 94%-os érzékenysége mellett a törzsek 4%-át mérsékelten érzékenynek találtuk. A *C. tropicalis* törzsek 85%-ban érzékenynek és 15%-ban mérsékelten érzékenynek bizonyultak. A *C. krusei* izolátumok 83%-a érzékeny, 17%-a mérsékelten érzékeny volt 5-flucytosinra. A fluconazol és itraconazol in vitro érzékenységének meghatározásakor az érzékenység mellett, a dózisfüggő érzékenységet határoztunk meg. A *C. albicans* törzsek esetében 94%-a érzékenységet és 4%-a dózisfüggő érzékenységet, a *C. tropicalis* törzsek esetében 78 %-ban érzékenységet, 12 %-ban dózisfüggő érzékenységet találtunk. *C. glabrata* és a *C. krusei* törzsek a dózisfüggő érzékenységi tartományban voltak. *C. albicans* izolátumok 92%-a érzékenységet és 2%-a dózisfüggő érzékenységet, a *C. glabrata* törzsek 5%-a érzékenységet, 63%-a dózisfüggő érzékenységet mutatott itraconazollal szemben. A *C. tropicalis* törzsek esetében 63%-a itraconazolra érzékeny és 31%-a dózisfüggő érzékeny volt. A *C. krusei* izolátumok 20%-a érzékenynek 40%-a dózisfüggő érzékenységűnek bizonyult itraconazollal szemben. Ketaconazollal szemben a *C. albicans* törzsek 99%-os, a *C. tropicalis* törzsek 88 %-os, a *C. krusei* törzsek 53%-os és a *C. glabrata* törzsek 33%-os érzékenységet mutattak. Az antifungális szerek kémiai szerkezete alapján kiválasztott speciális táptalajokon, a különböző sarjadzó gomba törzsek igényeinek megfelelő inkubációs idő biztosítása mellett az E teszt alkalmas módszer a rutin mikrobiológiai laboratóriumokban a sarjadzó gombák antimycotikumokkal szembeni érzékenységének meghatározására (24,26).

ad.3. A *M. hominis* és az *U. urealyticum* nehezen tenyésztethető kórokozók, amelyek az elsődlegesen atípusos kórfolyamatokban játszott szerepük mellett a szövődményként létrejövő krónikus nőgyógyászati, urológiai és andrológiai megbetegedésekben jelentenek különösen nagy gondot. A *M. hominis* és *U. urealyticum* kimutatása hagyományos tenyésztési eljárásokkal 21 napot vehet igénybe, gyors diagnosztikai eljárással ez az idő 48 órára csökkenthető. A tenyésztési vizsgálatok mellett e kórokozóknak a rezisztencia vizsgálatai nehezen kivitelezhetőek, nem a rutin laboratóriumok tevékenységei. A

hagyományos tenyésztési eljárással izolált *M. hominis* és *U. urealyticum* törzsek antibiotikum érzékenységének meghatározását mikro-leves hígítási módszerrel és E teszttel végeztük a pontos MIC érték meghatározására. A klinikai mintákból izolált *M. hominis* és *U. urealyticum* törzsek antibiotikum érzékenységének vizsgálata során a két módszerrel kapott MIC eredményeket összevetve, a *M. hominis* törzsek esetében a legnagyobb százalékos egyezést 100%-ban,  $\pm 2$ -es hígításnál ofloxacinra és ciprofloxacinra kaptuk. A doxycyclin vizsgálatok  $\pm 2$ -es hígításnál 98%-ban egyeztek a MIC eredmények a mikro-leves hígítási módszer ill. E teszt esetében. Az *U. urealyticum* törzsek vizsgálatok az ofloxacin, ciprofloxacin és a doxycyclin esetében találtuk a legnagyobb százalékos egyezést a két módszerrel kapott MIC értékek összehasonlításakor,  $\pm 2$ -es hígításnál 100%-osnak bizonyultak. A macrolid antibiotikumok vizsgálatok az erythromycin esetében a  $\pm 2$ -es léptékű egyezést az esetek 94%-ban kaptunk, azithromycin vizsgálatok magasabb, 98%-os egyezést kaptunk (20,27).

ad.4. Az urogenitális szervek kórokozóinak modern molekulárbiológiai módszerekkel történő kimutatása nem terjedt el széles körben. Hibridizációs próbával a *Candida* specíesek, a *T. vaginalis* és a BV egyik kórokozója a *G. vaginalis* mutatható ki. A három kórokozó közül a *Candida* spp. azonosítása a tenyésztéssel összehasonlítva 100% -os érzékenységűnek bizonyult, a közismerten gyengébb hatásfokú Gram-szerint festett keneteknél érzékenyebbnek. A három kórkép közül a *Candida* spp. okozta Vvv kimutatására az Affirm VPIII teszttel kapott eredményeket a tenyésztéssel összehasonlítva, a pozitív és negatív prediktív érték 100%-osnak bizonyult. Vizsgálataink során a BV diagnosztikájában 31 minta esetén a Gram-szerint festett kenet és a tenyésztési vizsgálat eredménye alapján, -amely megegyezett a gén próbával,- BV diagnózist lehetett felállítani. A BV diagnosztikájában két olyan pozitív eredményt kaptunk az Affirm VP III teszttel, amelyekből a tenyésztési eljárás során *G. vaginalis* nem tenyésztett ki. A vegyes anaerob flórában azonban, nagy csíraszámban izoláltunk *Mobiluncus* spp.-t, amely nem specifikus pozitívítást adhat a hibridizációs tesztben. A teszt a már tenyésztésre alkalmatlan, elpusztult kórokozók kimutatására is alkalmas, de a vegyes anaerob flórából nagy csíraszámban izolált *Mobiluncus* spp. is adhatott nem specifikus pozitívítást a DNS hibridizációs tesztben. Az összehasonlító vizsgálat 93,7%-os pozitív és 91,2 %-os negatív prediktív értéket adott. A *T. vaginalis* a harmadik, de nem elhanyagolható szerepet játszó szexuálisan átvihető kórokozó a Vvv-ban, amely a világon évente 180 millió ember fertőzését okozza. A *T. vaginalis* kimutatása során, míg tenyésztéssel 5 esetben igazolódott a kórokozó jelenléte a DNS hibridizációs technikával mindössze 2 esetben kaptunk pozitív eredményt. A *T. vaginalis* kimutatása során,

míg a CPLM táptalajban tenyésztéssel 12 esetben igazolódott a kórokozó jelenléte, a DNS hibridizációs technikával 10 esetben kaptunk pozitív eredményt. A pozitív prediktív érték 83,3%-os, a negatív 96,2 %-os értékűnek bizonyult. A klasszikus tenyésztési eljárásokkal összevetve, az Affirm VPIII DNS hibridizációs teszt rendkívül gyorsan, megfelelő érzékenységgel ad eredményt a Vvv leggyakoribb kórokozóinak, egyetlen tesztben történő kimutatásával (28).

Napjainkban a nukleinsav amplifikáción alapuló módszerek, mint pl. a PCR, alkalmazásának elérhetőségi feltételei egyre közelebb kerülnek a klinikai laboratóriumok mindennapjai számára is. A *M. genitalium* tenyésztése rendkívül nehézkes, hosszadalmas eljárás, a kórokozó PCR-el történő kimutatása gyors, érzékeny módszer. A *M. genitalium* referencia törzzsel a módszer érzékenységére kalibrációs vizsgálatokat, majd infertilitás miatt vizsgált férfi betegek mintáiból PCR vizsgálatot végeztük. Targetként a *M. genitalium* 140-kDa adhéziós proteinjének génjét választottuk, mely vélhetően esszenciális patogenitási szereppel bír a baktérium megbetegítő képessége során. Az előzetes kísérletek során az MgPa-1 és MgPa-3 primerekkel amplifikált előkezelt *M. genitalium* törzsből sikerült kimutatni a várt 281 bp nagyságú fragmentumot. PCR módszerünk alkalmasnak bizonyult a *M. genitalium* genom néhány száz kópiájának detektálására. A negatív kontrollként használt deionizált víz és egyéb mikrobiológiai vizsgálatokkal mind negatív, mind pozitív vizsgálati anyagok esetén hamis-pozitív eredmény nem fordult elő. A kontroll törzs 1000x-es hígítása esetén is detektálni tudtuk a baktérium jelenlétét igazoló amplikont. A *M. genitalium* főleg a férfi húgycsőben telepszik meg és okozza annak gyulladásos megbetegedését. Mivel az általunk vizsgált minták infertilitás miatt komplex szűrővizsgálat részeként kerültek a laboratóriumba feldolgozásra, valószínűsíthetően ez lehet az oka annak, hogy a modellkísérlet sikeres eredményei ellenére nem sikerült pozitív eredményt kapnunk. Szűkebb, klinikai tünetek alapján jobban szelektált betegcsoportban folytatva vizsgálatainkat, nagyvalószínűséggel felmérhető lesz a *M. genitalium* hazai előfordulása (136).

## Summary

It has been demonstrated in the past few years that, besides the traditional sexually transmitted diseases (STD) several new pathogens spread mainly by sexual contact. The expression STD known implies the infectious character and the mode of transmission of these diseases.

Beside the conventional STD pathogens, the other STD pathogens have become significant with the improvement of the diagnostic methods. The STD play an important role diseases among the of different origins, despite the fact that the sexually transmissible diseases, including the traditional STD group, are in most cases not casual infections. Changes in the mental attitudes relating to sexual life, promiscuity, prostitution, the effects of drugs and alcohol, and the beginning of sexual activitate a younger age all involve the possibility of acquisition of infection. Besides asymptomatic patients it is ever play a great part in the transmission more obvious that there are asymptomatic carriers and patients with later complications who also play a great part in the transmission.

The role of STD is beyond question in infertility, premature delivery, abortion and gynecological tumors. In the event of an incorrect or late diagnosis of infection, the organs, involved may be seriously damaged or there may be a decrease in the fertility rate. In the past few decades improvements in diagnostic methods have led to the recognition of a new generation of STD which in contrast with the traditional STD, are mainly asymptomatic infections which causes difficulties in the early diagnosis. The vaginal flora has been estimated by Gram staining for several years. Detection of the vaginal normal flora is nowadays a result of a very complex process. This flora is characterized predominantly by different *Lactobacillus species*, and by the presence of numerous facultative and obligate anaerobic bacteria, which can be identified following the improvement, in microbiological cultivation methods. Some important pathogens of the urogenital tract may also spread sexually. New methods have been introduced for the detection of these pathogens in clinical microbiological diagnostics. The introduction of new microbiological methods in no way means that the traditional cultivation methods can be dispensed with in the diagnosis of STD.

### Ad 1.

The correct demonstration of the most important vulvovaginal vaginitis pathogens is not wide spread in routine laboratories. In the course of our investigations, we have performed complete cultivation examinations of vaginal discharges for aerobic and anaerobic bacteria, yeasts, *Mycoplasma*, *Ureaplasma* and *Trichomonas*. We compared the results of Gram staining with the results of the cultivation of these vaginal samples (25, 31).



By means of the cultivation of 2622 urogenital samples from patients with infectious processes in the urogenital tract, we succeeded in isolating a pathogenic microorganism in 33% of the cases. On analysis of the positive cases the rate of occurrence of aerobic pathogens was found to be 35%. The detection of bacterial vaginosis (BV) revealed 194 positive cases (16%) with a great number of mixed anaerobic flora. The risk factors in urogenital tract infections in women include the application of intrauterine devices (IUD). We examined one of the pathogenic factors (the biofilm producing capability) of STD pathogens with a double fluorescence staining method, with detection with the aid of confocal laser scanning microscopy. Mainly anaerobic bacteria and yeasts associated with BV were isolated, which proved to be biofilm producers on further examination.

Pathogens were isolated significantly more frequently from vaginal samples of patients with vulvovaginal vaginitis than from cultured specimens of healthy, asymptomatic women who had no complaints.

## Ad 2.

The identification of yeasts at a species level in urogenital samples is of therapeutic importance. Besides *C. albicans*, other yeasts resistant to antifungal drugs have arisen increasingly more frequently in the recent past, and there was therefore a need for the introduction of rapid, easy and exactly reproducible identification methods for routine diagnosis. From comparisons of the results attained with ChromAgar Candida and the Api 20 AUX strip, the four most common human pathogenic yeasts, are *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. tropicalis*, with rates of 96.7-100%. In our experience, ChromAgar Candida is very useful in routine laboratories identification for the of isolates either from a systemic mycosis or from a vaginal yeast infection in gynecological cases and for the exploration of mixed yeast infections. The well-known Kirby-Bauer disk diffusion method is not reliable for the detection of the antifungal sensitivity of yeasts. We therefore chose MIC detection with micro-broth dilution and E test methods. The least deviation, and therefore the highest percentage agreement between the two methods was observed for *C. albicans* strains, with 90-100% homology in  $\pm 2$  dilution steps. Examinations with antifungal drugs revealed the best reproducibility with amphotericin B, followed by fluconazole and itraconazole. The differences in the results obtained with the macrodilution method and the E test with reference strains never demonstrated any difference in susceptibility for the examined antifungal drugs. The antifungal susceptibilities of yeasts isolated from the urogenital tract were examined by the E test method. The susceptibility to amphotericin B was 100% for *C. albicans* and *C. glabrata*, 95% for *C. tropicalis* and 86% for *C. krusei*. 5-flucytosine isolates was effective

against almost all *C. glabrata* strains, but against only 94% of *C. albicans* with a 4% population with intermediate sensitivity. 85% of *C. tropicalis* strains were sensitive and 15% of intermediate sensitivity while 83% of *C. krusei* strains were sensitive and 17% of intermediate sensitivity to 5-flucytosine. Besides determination of the in vitro susceptibilities to fluconazole and itraconazole, we also determined the doses dependent susceptibilities. In *C. albicans* strains there was a 94% susceptibility and a 4% doses dependent susceptibility, and in *C. tropicalis* strains there was a 78% susceptibility and a 12% doses dependent susceptibility, but *C. glabrata* and *C. krusei* strains lay in the doses dependent susceptibility range. *C. albicans* strains displayed a 92% susceptibility and a 2% doses dependent susceptibility, while *C. glabrata* strains exhibited a 5% susceptibility and a 63% doses dependent susceptibility to itraconazole. 63% of *C. tropicalis* strains were susceptible and 31% of them doses dependent susceptible to itraconazole, while in *C. krusei* strains the corresponding levels were 20% and 40%. Ketoconazole was effective against 99% of *C. albicans* strains, 88% of *C. tropicalis* strains, 53% of *C. krusei* strains and 33% of *C. glabrata* strains. With culture media selected on the basis of the chemical structures of the antifungal drugs, and the different incubation times for yeast strains with different growth requirements the E test is a suitable method in routine laboratories for antifungal susceptibility detection in the case of yeasts.

### Ad 3.

*M. hominis* and *U. urealyticum* which are pathogens that can be cultured only with difficulty, play a primary role in atypical processes and are of importance in chronic gynecological, urological and andrological diseases. The detection of *M. hominis* and *U. urealyticum* by traditional cultivation methods may take 21 days, but with fast diagnostic methods this can be reduced to 48 hours. Besides the cultivation, resistance examinations on in these organisms are difficult, and are not among the duties of routine laboratories. Antibiotic susceptibility testing of *M. hominis* and *U. urealyticum* isolated by traditional cultivation was performed by means of the microdilution method and the E test with accurate MIC detection. *M. hominis* gave, the greatest agreement between the results for these two methods in antibiotic susceptibility testing 100% for ofloxacin and ciprofloxacin in  $\pm 2$  dilution steps. In doxycycline examinations, the MIC agreement for the microdilution method and the E test in was 98%  $\pm 2$  dilution steps. The best percentage agreement between the two methods for *U. urealyticum* investigations was 100% in  $\pm 2$  dilution steps for ofloxacin, ciprofloxacin and doxycycline. Among the macrolides, erythromycin gave 94% agreement and azithromycin 98% agreement in  $\pm 2$  dilution steps (20, 27).

#### Ad 4.

The detection of urogenital tract pathogens by modern molecular biological methods is not wide-spread. *G. vaginalis* (one of the pathogens of BV), *T. vaginalis* and *Candida* species can be detected by hybridization probes. Of these 3 pathogens, the identification of *Candida* species proved to be 100% and, more sensitive as compared to the well-known lower potency of Gram staining. For vulvovaginal vaginitis caused by *Candida spp.*, the Affirm VP III test results compared to culturing had a positive and negative predictive value of 100%. Hybridization methods were more sensitive than Gram staining. We obtained 2 positive results with the Affirm VP III test during the diagnosis of BV, where as we could not cultivate *G. vaginalis* from these samples. However a great number of *Mobiluncus* spp. were isolated from mixed anaerobic flora, which can result in non-specific positivity in the hybridization procedure. During our investigations on the diagnosis of BV, 31 samples examined by Gram staining and cultivation gave a diagnosis of BV, which was the same as the Gene Probe result. The test is able to detect dead organisms, that are unsuitable for cultivation, but the numerous *Mobiluncus* spp. isolated from mixed anaerobic flora can give a non-specific positive result in the DNA hybridization test. Comparative study revealed a 93.7% positive predictive value and a 91.2% negative predictive value. *T. vaginalis* is the third, but not negligible sexually transmissible pathogen in vulvovaginal vaginosis, which every year infects 180 million people worldwide. During the detection of *T. vaginalis*, 5 positive results were obtained with the cultivation method, but only 2 were positive with DNA hybridization technique. On cultivation in CPLM, media there were 12 positive results but only 10 with the DNA hybridization test, with a positive predictive value of 83.3% and a negative predictive value of 96.2%. There was no possibility for the detection of all the pathogens of vulvovaginal vaginitis in one simple test. As compared to traditional cultivation methods, the Affirm VP III DNA hybridization test is very rapid and gives results with high sensitivity in the diagnosis of vulvovaginal vaginitis (28).

The conditions are now given for clinical laboratories to apply nucleic acid-based methods, e.g. PCR. The culturing of *M. genitalium* is very difficult and time-consuming, but detection of the pathogen by PCR is a quick and sensitive method. We performed a calibration survey with a *M. genitalium* reference strain to detect the sensitivity of the method then carried out PCR on male samples investigated for infertility. The target was the gene of the 140 kDa adhesin protein of *M. genitalium*, which has an essential pathogenic role in bacterial infectivity. During our preliminary studies, we were able to detect the expected 281 bp fragment with the amplification of pretreated *M. genitalium* strains, using MgPa-1 and MgPa-3 primers. Our PCR method was able to detect as few as several hundred copies of the *M.*

*genitalium* genome. False-positive results did not occur during examinations of deionized water, as a negative control, or for clinical samples that were positive or negative by other microbiological methods. In a 1000- fold dilution of the control strain, we succeeded in detecting the amplicon showing the presence of the bacterium. *M. genitalium* establishes itself in the male urethra and causes its infectious disease there. Since the examined samples formed part of a complex investigation for infertility, this was the proposed reason for the unsuccessful detection of a positive result, despite the successful model trial. The prevalence of *M. genitalium* in Hungary could be estimated by continuing the investigation with a restricted group of patients better selected. on the basis of the clinical compliants.

## Irodalom

1. Amsel R, Totten P, Spiegel C, Chen K, et al. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial epidemiological associations. *Am J Med* 1983.74:14-22.
2. Anwar H, Dsgupta MK, Costerton JW. Testing the susceptibility of bacterial biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1990.34:2043-6.
3. Barlett JG, Moon NE:, Goldstein PR, Goren B, Orderdonk AB, and Polk BF. Cervical and vaginal bacterial flora. Ecologic niches in the female lower genital tract. *Am J Obstet Gynecol* 1978.130:658-61.
4. Barlett JG, Orderdonk AB, Drude E. et al. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J Infect Dis* 1977.136:271-8.
5. Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. Yeast characteristics and identification. Cambridge University Press. Cambridge. 1990.
6. Berke I, Tierno PM. Comparison of Efficacy and Cost-Effectiveness of BIOMIC video and Vitek Antimicrobial Suseptibility Test Systems for Use in the Clinical Microbiology Laboratory. *J Clinical Microbiol* 1996.34:1980-4.
7. Bieselden AM. and Hillier SL. Evaluation of Affirm VP microbial Identification Test for *Gardnerella vaginalis* and *Trichomonas vaginalis*. *J Clinical Microbiol* 1994.32:148-52.
8. Bolmstöm A, Arvidson S, Ericsson M, and Karlsson A. A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. ICAAC. 1988. Los Angeles. Poster No 1209.
9. Braun P, Lee YH, Klein JO. et al. Birth weight and genital mycoplasma in pregnancy. *New Engl J Med* 1971.284:167-71.
10. British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Working party report: Antifungal drug susceptibility testing. *J Antimicrob Chemoth* 1995.36:899-909.
11. Cadieux N, Lebel P, and Brousseau R. Use of a triplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in the presence of human DNA. *J Gen Microbiol* 1993.139:2431-7.
12. Cassel GH, and Cole BC. Mycoplasmas as agents of human disease. *New Engl J Med* 1981.304:80-9.
13. Cassel GH, Waites KB, Watson HL, Crouse DT, and Harasawa R. *Ureaplasma urealyticum* intrauterine infection: Role in Prematurity and Disease in Newborns. *Clin Microbiol Rev* 1993. 6:69-87.
14. Chen SCA, O'Donnell Gordon S, and Gilbert GL. Antifungal susceptibility testing using the Etest: Comparison with the broth macrodilution technique. *J Antimicrob Chemoth* 1996.37:265-73.

15. Colombo A., Barchiesi F, McGough D, Fohergill AW, Bolmström A, and Rinaldi MG. Antifungal susceptibility testing of yeasts with Etest azole strips: a comparison with the NCCLS macrobroth dilution in the evaluation of 80 clinical yeast isolates. XII Congress of the International Society for human and animal mycology. Adelaide, South Australia, March 1994.13-15.
16. Corradi Gy, Molnár Gy, Pánovics J. A genitális mycoplasmák andrológiai jelentősége. Orvosi Hetilap 1992.48:3085-8.
17. Cristin GA. Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. Science 1985.228:990-3.
18. DeMeo LR, Draper DL, McGregor JA, Moore DF, Peter CR, Kapernick PS, and McCormack WM. Evaluation of deoxyribonucleic acid probe for the detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal secretions. Am J Obstet Gynecol 1996.174.4:1339-4.
19. Deák J, Nagy E, Weszelovszky E, Veréb I, Dósa E, et al. Szexuális úton átvitt kórokozók kimutatása autótúrázó menti és városi prostituáltak körében. Magyar Venerol Arch. I.évf. 2.szám 1997.107-116.
20. Dósa Erika. Az urogenitális szervek gyulladásos megbetegedéseit okozó humán mycoplasma törzsek laboratóriumi vizsgálata. Egyetemi doktori értekezés 1984. Szeged.
21. Dósa E, Nagy E. Evaluation of rapid latex agglutination test for detection of group B streptococci in the vagina. Acta Microbiol et Immunol. Hung. 1994.3.309.
22. Dósa E, Nagy E. *Streptococcus agalactiae* direkt kimutatása hüvelyváladékból latex teszttel. Magyar Nőorvosok Lapja, 1995. 58. 441-445.
23. Dósa E, Szőke I, Szöllősi J, Szénási Zs, Nagy E. Die Rolle der auf sexuellem Wege Übertragbaren Erreger bei den Untersuchungen der Sterilität des Mannes. J Fertilitat und Reproduktion Suppl 28p, 1995.
24. Dósa E, Nagy E. Nahere Identifizierung der *Candida* Spezies und Bestimmung der Empfindlichkeit der antifungale Medikamente. Immun Infect Suppl 74p, 1995.
25. Dósa E, Urbán E, Szőke I, Szénási Zs, et al. Investigation of prevalence of BV and BV-related conditions among fertile women. Sex Transm Dis 2001. (közlés alatt) International Congress of STD, 1997. Seville, Abstract book. P-689.
26. Dósa E, Nagy E. Klinikai vizsgálati mintákból származó sarjadzó gomba törzsek közelebbi azonosításának és antimycotikum érzékenységük meghatározásának újabb lehetőségei. Klin Kísérl Lab Med 1997.24:189-197.

27. Dósa E, Nagy E, Falk W, Szőke I, Ballies U. Evaluation of Etest for susceptibility testing of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. J Antimicrob Chemoth 1999.43:575-8.
28. Dósa E, Urbán E, Földes M, Török L és mts.-i. Az Affirm VPIII DNA hibridizációs teszt alkalmazása a női urogenitális traktus kórokozóinak vizsgálatában. Magyar Nőorvosok Lapja 2000. 63:121-5.
29. Douherty SH, Simmons RL. Infections in bionic man: the pathology of infections in prosthetic devices. Curr Probl Surg 1982.19:265-319.
30. E test technical guide. AB Biodisc 1994. No.4.b. antifungal susceptibility testing of yeasts. Solna Sveden
31. Elshibly S, Tshoudomirova K, Dósa E, Hellberg D, et al. Vaginal flora changes and reproducibility of interpretation of Gram-stained vaginal smears. Clinical Microbiol Infect 1998. 4.3:173-5.
32. Eschenbach DA. Upper genital tract infections in patients with bacterial vaginosis. Report of Third International Symposium on vaginitis/vaginosis 1994.43-53. Oxford Clinical Communications, Oxford, 1994.
33. Evans AS. Causation and disease: The Henle-Koch postulates revisited. Yale J. Biol. Med. 1976, 49:175- 95.
34. Ferris DG, Hendrich J, Payne PM, Getts A, et al. Office Laboratory diagnosis of vaginitis J Fam Practice 1995.41.6:575-81.
35. Fodor E, Dósa E, Nagy Á, Nagy E, Ferenczi L. Karyotyping of *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolate from recurrent vaginal infections by pulsed-field gel electrophoresis. Clinical Microbiol Infect. 2000.6: Suppl.1. 35.
36. Földes M, Dósa E, Nagy E, Dobozy A. Häufigkeit und Erkennung der Sexuell übertragbaren Krankheiten. Immun Infect 1995. Suppl 20.
37. Fujimaki K, Ikeda Y, Takahata M, Yasuda T. Characteristics of biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Chemoth 1992.40:886-93.
38. Gardner HI and Dukes CD New etiologic agent in non-specific bacterial vaginitis. Science 1954. 120:853.
39. Gambini, D, Decleva I, Lupica L, Ghislanzoni M, et al. *Mycoplasma genitalium* in males with nongonococcal urethritis. Prevalence and clinical eradication. Sex Transm Dis 2000.27:226-9.
40. Goode MA, Gramer K, Guns JG. Infektiv vaginitis. Orvostovábbképző Szemle 1995.I. 2.



41. Gravett MG, Hummel D, Eschenbach DA. et al. Preterm Labor Associated with subclinical amniotic fluid infection and with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol* 1986;67:229-37.
42. Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* (Gardner and Dukes) to a new genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. *Int J Syst Bacteriol* 1980. 30:170.
43. Gristin GA. Biofilm and chronic bacterial infections. *Clin Microbiol Newsletter* 1994;16:171-6.
44. Gristin GA. Comparative in vitro antibiotic resistance of surface-colonizing coagulase negativ staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;33:813-6.
45. Hellberg D, Nilson S, Mardh P-A. Epidemiology of bacterial vaginosis and interrelated conditions. In: *Bacterial vaginosis*. Mardh, PA, Eschenbach DA, and Martinez de Oliveira (organizers) Oxford Clinical Communications, Oxford, 1994. 3-14. Report of Third International Symposium on vaginitis/vaginosis.
46. Hill GB. The microbiology of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:450-4.
47. Hillier SL, Krohn MA, Nugent RP, and Gibbs RS. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *Am Obstet Gynecol* 1993;169:455-9.
48. Hillier SL, Krohn MA, Rabe LK, Klebanoff SJ and Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Infect Dis* 1993. 16 Suppl 4:S 273-81.
49. Hillier SL. and Holmes KK. *Laboratory Methods for the Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases*, 2<sup>nd</sup> ed. Holmes KK, PA Mardh, PF Sparling and PJ Wiesner (eds). San Fransisco. McGraw-Hill Information Services Company. Chapter 6. 1990.547-59.
50. Hooton TM, Roberts PL, Stamm WE, Roberts MC, et al. Prevalence of *Mycoplasma genitalium* determined by DNA probe in men with urethritis. *Lancet* 1988;1:266-8.
51. Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *J Antimicrob Chemother* 1990;26:1-6.
52. Innis MA, Gelfan DU, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: A guide to methods and applications. Optimization of PCRs*.-Acad. Press Inc, San Diego, California, USA. 1990. 3-12.
53. Innis, MA. Gelfan DU, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: A guide to methods and applications. Procedures to minimize PCR-product carry-over*. Acad. Press Inc, San Diego, California, USA. 1990.142-5.
54. Innis, MA. Gelfan DU, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols: A guide to methods and applications. Sample preparation from blood, cells and other fluids*. Acad. Press Inc, San Diego, California, USA. 1990.146-52.

55. Isenberg H.D. Clinical microbiology procedures handbook. American Society for Microbiology, Washington 1992.
56. Janier M, Lassau F, Casin I, et al. Male urethritis with and without discharge: a clinical and microbiological study. Sex Transm Dis 1995;22:244-52.
57. Jensen JS, Orsum R, Dohn B, Uldom S, et al. *Mycoplasma genitalium*: A cause of male urethritis? Genitourin Med 1993;69:265-9.
58. Jensen JS, Uldum SA, Sondergard-Andersen J, Vuust J, et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. J Clinical Microbiol 1991;29:46-50.
59. Jensen JS, Uldum SA, Sndergard-Andersen J, Vuust J, and Lind K. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. J Clinical Microbiol 1996;34:286-91.
60. Joesoef MR, Hillier SL, Josodiwondo S and Linnan M. Reproducibility of a scoring system for Gram stain diagnosis of bacterial vaginosis. J Clin Microbiol 1990;29:1730-1.
61. Johnson SR, Petzhold CR and Galask RP. Qualitative and quantitative changes of the vaginal microflora during the menstrual cycle. Am J Reprod Immunol Microbiol 1985;9:1-5.
62. Kent HL. Epidemiology of vaginitis. Am J Obstet Gynecol 1991;165. (4 Pt 2):1168-76.
63. Kenny GE, Hooton TM, Roberts MC, Cartwright FD, and Hoyt J. Susceptibilities of genital mycoplasma to the newer quinolones as determined by the agar dilution method. J Antimicrobiol Chemoth 1989;33:1.103-7.
64. Kevin C. Hazen New and emerging yeast pathogens. Clin Microbiol Rev 1995;8.4:462-78.
65. Klinikai és járványügyi bakteriológia. Kézikönyv. Főszerkesztő: Czírók É. Melánia Kft. Budapest. 1999.
66. Kobayasshi H. Bacterial biofilm. Kansenshogaku Zasshi. 1991;21:161-78.
67. Kasten FH. Cell structure and function by immunospectrophotometry. Kohen E, Hirschog JG. Academic Press. 1989. 4-41.
68. Knausz M, Dósa E, Niederland T, Nagy E, Rozgonyi F. Meningoencephalitis in a newborn caused by maternal *Mycoplasma hominis*. Clinical Microbiol Infect. 2000;6: Suppl.1. 196.
69. Krauts DC, and Taylor-Robinson D. Mycoplasmas which infect humans. Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. Maniloff (ed.) 1992. Chapter 25. 417-45. American Society for Microbiology Washington. DC.

70. Larson PG, Platz-Christensen JJ. Bacterial vaginosis and the vaginal leucocyte/epithelial cell ratio in women attending an outpatient gynecology clinic. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1991.42:217-20.
71. Levison ME, Tretmann I, Quach R, Sladowski C, and Floro CN. Quantitative bacteriology of the vaginal flora in vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1979.133:139-44.
72. Lind KB, Lindhardt BO, Schütten HJ, Blom J et al. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clinical Microbiol* 1984.20:1036-43.
73. Lind KB. Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Lancet* 1982, ii:1158-9.
74. Lindner JG, Plantema FH and Hoogkamp-Korstanje JA. Quantitative studies of the vaginal flora of healthy women and of obstetric and gynecological patients. *J Med Microbiol* 1978.11:233-41.
75. Mahony J, Chong S, Jang D, Luistra K. et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *J Clinical Microbiol* 1998.36:3122-6.
76. Maniloff J. (ed.) *Mycoplasmas. Molecular Biology and pathogenesis*. 1992. American Society for Microbiology. Washington, DC.
77. Mardh P-A. and Weström L. Tubal and cervical culture in acute salpingitis with special reference to *Mycoplasma hominis* and T-strain mycoplasmas. *Br J Ven Dis* 1970.46:390-7.
78. Mardh P-A. Human respiratory tract infections with mycoplasmas and their in vitro susceptibility to tetracyclines and some other antibiotics. *Chemotherapy* 1975. 21:47-57.
79. Mardh P-A. The vaginal ecosystem. *Am J Obstet Gyn* 1991.165:1163-8.
80. Masur H, Johnson WD. Prosthetic valve endocarditis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1989.80:31-7.
81. McCormack W.M, Rosner B, Yhu-Hsiung L, Munoy A, et al. Effect on birth weight of erythromycin treatment of pregnant women. *Obstet Gynecol* 1987.69:202-7.
82. McGregor JA, French JI, Parker R. Prevention of premature birth by screening and treatment for common genital tract infection: results of prospective evaluation. *Am Obstet Gynecol* 1995.173:157-67.
83. Mészáros Gy, Annus J, Dósa E, Deák J. *Mycoplasma hominis* előfordulása IUE-t viselő nőknél. *Orvosi Hetilap*. 1986.127.19:1125-7.

84. Mészáros Gy, Annus J, Dósa E, Deák J. *Mycoplasma hominis* gyakorisága a genitális traktusban a terhesség első felében. Orvosi Hetilap. 1988.129.33:1749-53.
85. Murray PR. Manual of Clinical Microbiology. 7<sup>th</sup> Edition. American Society for Microbiology, Washington, DC. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. 1999. 782-794.
86. Nagy E, Dósa E, Szőke I, Török L. Bakteriális vaginosis: endogen infectio vagy szexuálisan átvihető megbetegedés? Magyar Vener Arch 1997.1.évf.I.szám 23-27.
87. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS USA. 2000. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard. Document. Approved guideline M27-A. Villanova, Pa.
88. National Committee for Clinical Laboratory Standards. NCCLS USA. 2000. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. Approved guideline M100-S10(M7), Villanova, Pa.
89. Odds FC, and Bernaerts R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J Clinical Microbiol 1994.32:8.1923-9.
90. Ohgaki N. Bacterial biofilm in chronic airway infection. J Infect Dis 1994.68:135-51.
91. Ohtami H. Study on pathogenetic role of alginate produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in diffuse panbronchiolitis. Kansenshogaku Zasshi. 1995.69:553-67.
92. O'Leary WM, Frick J, Einfluss von Mycoplasmen auf die mannliche Fertilitat. Acta Urol 1976.7:121-5.
93. Osborne NG, Wright RC, and Grubin L. Genitalbacteriology: a comparative study of premenopausal women with post menopausal women. Am J Gynecol 1979.135:195-8.
94. Paavonen J, Miettinen A, Stevens CE, Chen KCS, and Holmes KK. *Mycoplasma hominis* in non-specific vaginitis. Sex Transm Dis 1983.10:Suppl. 271-5.
95. Palu G, Valisena S, Barile MF, and Meoni GA. Mechanism of macrolide resistance in *Ureaplasma urealyticum*: a study on collection and clinical strains. Eur J Epidemiol 1989.5:146-53.
96. Pederson SS, Hoiby N, Esperson F, Koch G. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Thorax. 1992.47:6-13.
97. Persing DH. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. J Clinical Microbiol 1991.29:1281-5.
98. Pfaller MA. Houston A, and Coffmann S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*,

- Candida krusei* and *Candida (Torulopsis) glabrata* Clinical Microbiol 1996.34:1.58-61.
99. Ramphal R, Pier GH. Role of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolisaccharide in adherence to tracheal cells. Infect Immun 1985.47:1-4.
  100. Rein MF. *Trichomonas vaginalis*, Principles and practice of Infectious Diseases, 3rd ed. Mandell GL, RG Douglas, Jr and JE Bennett eds). New York: Churchill Livinstone Inc. 1990. 2115-8.
  101. Renaudin, H. and Béb  ar, C. Evaluation des systemes Mycoplasma PLUS et SIR Mycoplasma pour la delection quantitative et l'etude de la sensibilite aux antibiotiques des mycoplasmes genitaux. Pathol Biol 1990.38:431-5.
  102. Rex J. Antifungal susceptibility testing New NCCLS interpretive guidelines J Clinical Microbiol Infect 1997.vol. 3. Suppl.2. 14.
  103. Ridgway GL, Mumtaz G, Gabriel FG, and Oriel JD. The activity of ciprofloxacin and other 4-quinolones against *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmas in vitro. Eur J Clin Microbiol 1986.3:344-9.
  104. Roberts MC, and Kenny GE. Dissemination of the tetM tetracycline resistance determinant to *Ureaplasma urealyticum*. Antimicrob Agents Chemoth 1986.29:350-2.
  105. Roberts MC, and Kenny GE. Tetracycline resistant *Ureaplasma urealyticum*. Ped Infect Dis 1986.5:338-40.
  106. Roberts MC. and Hillier SL. Genetic basis of tetracycline resistance in urogenital bacteria. Antimicrob Agents Chemoth 1990.34:261-64.
  107. Roberts MC. Antibiotic resistance. In: Mycoplasmas Molecular Biology and pathogenesis. Maniloff, J. (ed.). American Society for Microbiology 1992. Washington, D.C. 513-23.
  108. Robertson JA, Coppola JE, and Heisler OR. Standardized method for determining antimicrobial susceptibility of strains of *Ureaplasma urealyticum* and their response to tetracycline, erythromycin and rosaramicin. Antimicrob Agents Chemoth 1981.28:53-58.
  109. Romero R, Mazor M, Oyarzun E, Sitori M, et al. In genital colonization with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* associated with prematurity/low birth weight? Obstet Gynecol 1989.73:532.
  110. Sautter RL and Brown WJ. Sequential vaginal cultures from normal young women. J Clinical Microbiol 1980.11:479-84.
  111. Senterfit LB. Antibiotic sensitivity testing of mycoplasmas. Methods in Mycoplasmaology Academic Press. INC. London. 1983.II. 397-401.



112. Senterfit LB. Comparative *in vitro* sensitivity of *Mycoplasma pneumoniae* to saramicin, erythromycin, tetracycline and spectinomycin. Drug Exp Clin Res 1983.3:317-9.
113. Sephard MC. and Lunceford CD. Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasmas) in primary cultures of clinic material. J Clinical Microbiol 1976.3:613-25.
114. Sharma S, Brousseau R and Kasatiya S. Detection and confirmation of *Mycoplasma genitalium* in urogenital specimens by PCR. J Clinical Microbiol 1998.36:277-80.
115. Simon Gy, Török I, Gombás betegségek laboratóriumi diagnosztikája és terápiája. Dermato-és nyálkahártya mikózisok klinikuma. Kornétás Kiadó 1998.13-20.
116. Simon Gy, Török I, Stelich G, Vákonyi V, és mts. Sarjadzó gombák szerepe az STD-ben: diagnosztika, klinikum és terápia. Gyógyszereink. 1995.45:67-75.
117. Slusher MM. Extended-wear lenses, biofilm and bacterial adhesion. Arch. Ophtalm 1987.105:110-5.
118. Sobel JD. Vulvovaginitis. Dermatol Clin 1992.10:339-59.
119. Spiegel CA, Amsel R. and Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. J Clinical Microbiol 1983.18. 170-7.
120. Spiegel CA. Bacterial vaginosis. Clin Microbiol Rev 1991.4:485-502.
121. Spiegel CA. Diagnosis of bacterial vaginosis Report of Third International Symposium on vaginitis/vaginosis 1994.25-31.  
Oxford Clinical Communications, Oxford.
122. Spiegel CA. Laboratory Methods for the Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases, 2<sup>nd</sup> ed. Wentworth BB, FN Judson, MUR Gilchrist (eds.) A. Pub. Health Assoc. Chapter 6. 1991.182-5.
123. Szőke I, Török L, Dósa E, Nagy E, and Scultéty S. Isolation rate of anaerobic bacteria from expressed prostata secretum of patients with chronic prostatitis. Reviews in Medical Microbiology 1998. (suppl.1.) 91-3.
124. Szőke I, L. Török, E. Dósa, E. Nagy, S. Scultéty. The possible role of anaerobic bacteria in therapy resistant chronic prostatitis Inter J of Andrology, 1998. 21:163-8.
125. Taylor-Robinson D. and McCormack WM. The genital mycoplasmas (first of two parts). New Engl J Med 1980.302:1003-10.
126. Taylor-Robinson D. The history and role of *Mycoplasma genitalium* in sexually transmitted diseases. Genitourin Med 1995.71:1-8.

127. Toye B, Woods W, Bobrowska M, and Ramotor K. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. J Clinical Microbiol 1998.36:2356-8.
128. Török L, Szőke I, Dósa E, Nagy E, Scultéty S. Anaerob baktériumok mint lehetséges STD-kórokozók szerepe a férfi infertilitásban. Magyar Venerol Arch. 1997. I.évf.1.szám, 21-24.
129. Tully JG, Rose DL, Baseman B, Dallo SF, and Davis CP. Pathogenic mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma. Science 1977.195:892-4.
130. Tully JG, Taylor-Robinson D, Cole RM, Rose DL. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. Lancet 1981.i:1288-91.
131. Tully JG, Taylor-Robinson D, Rose DL, Cole RM. et al. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. Int J Syst Bacteriol 1983.33:387-96.
132. Uno M, Deguchi T, Komeda H, Hayasaki M, et al. *Mycoplasma genitalium* in the cervixes of Japanese women. SexTransm Dis 1997.24:284-6.
133. Vaneechoutte, M. and van Eldere, J. The possibilities and limitations of nucleic acid amplification technology in diagnostic microbiology. J Clinical Microbiol 1997.46:188-94.
134. Várkonyi V, Balázs É, Horváth A, Berecz M. Szexuális úton terjedő betegségek. Gyógyszereink. 1995.45:57-60.
135. Várkonyi V, Balázs É, Széll A, Stehlich G, és mts. A mikrobiológiai diagnosztika helye és szerepe az STD megbetegedések felismerésében és kezelésében. Gyógyszereink 1995.45:62-7.
136. Veréb I, Dósa E, Nagy E. *Mycoplasma genitalium* vizsgálatának bevezetése PCR módszerrel. A Magyar Infektológiai Társaság 2000. évi pályázatának 4. helyezett pályamunkája.
137. Waites KB, Cassell GH, Canupp KC, and Fernandes PB. In vitro susceptibilities of mycoplasmas and ureaplasmas to new macrolides and aryl-fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemoth 1988.32:10.1500-2.
138. Watanabe T. Observation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with CLSM. Kansenshogaku Zasshi. 1995.1:14-22.
139. Weström L, Evaldsomm G, Holmes KK, van der Maijden WI et al. Taxonomy of vaginosis: bacterial vaginosis, a definition. In: Mardh P-A, Taylor-Robinson D. eds. Bacterial vaginosis. Uppsala, Sweden: Almqvist and Wiksell International. 1984. 259-260.
140. Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM. Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. J Clinical Microbiol 1995.33:2643-6.

141. Zimmerli WD, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infections: evidence for local granulocyte defect. J Clin Invest. 1984;73:1191-200.
142. Zinnemann K and Turner GC. The taxonomic position of '*Haemophilus vaginalis*' (*Corynebacterium vaginale*). J Path Bacteriol. 1963. 85:213.